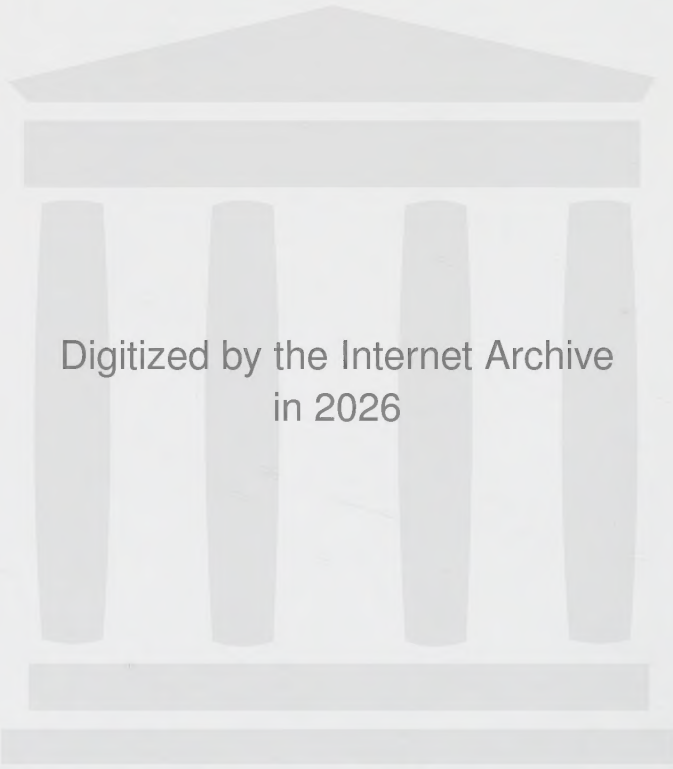


Zur vergleichenden Biochemie des N-Acetyl-dopamins

Peter Herrlich

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KOMMISSAR, DIREKTOR: PROF. DR. PETER KARLSON

Zur vergleichenden Biochemie
des N-Acetyl-dopamins

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians Universität
zu München

vorgelegt von
Peter Herrlich
aus München

München 1964

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Karlson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Theodor Bücher

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1964



Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Karlson in der Zeit von Februar 1962 bis April 1963 ausgeführt.

Herrn Professor Karlson möchte ich für alle Förderung, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine geduldige Hilfe bei den vielen Schwierigkeiten von Herzen danken. Mein Dank gebührt auch den anderen Mitarbeitern im Arbeitskreis, vor allem Herrn Dr. C.E. Sekeris, für die Einführung in die Methodik und eine Reihe freundschaftlicher Ratschläge und Anregungen.

Frl. Poppe hat die Infrarotspektren aufgenommen, Frl. Vogel führte die Arbeiten am Aminosäureanalysator aus.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

<u>Einleitung</u> und Ziel der Arbeit	1
<u>Eigene Ergebnisse</u>	8
<u>Teil I: N-Acetyl-dopamin bei Insekten</u>	8
A. <u>Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin als Tyrosinmetabolit</u>	8
1. Über den Tyrosinstoffwechsel und das Vorkommen von N-Acetyl-dopamin bei <i>Drosophila melanogaster</i>	8
2. <i>Schistocerca gregaria</i> Forskal	9
a) Vorkommen und Biosynthese von N-Acetyl-dopamin	9
Lokalisation in der E p i d e r m i s	11
b) Der katabolische Stoffwechsel von Tyrosin (Stoffwechsel des K ö r p e r i n n e r e n)	13
c) Schema des Tyrosinstoffwechsels von <i>Schistocerca</i>	18
d) Der Tyrosinstoffwechsel in der larvalen Entwicklung	20
Besprechung	25
B. <u>Beobachtungen über die Sklerotisierung der Insektencuticula (Stoffwechsel der C u t i - c u l a)</u>	26
Der Begriff der Sklerotisierung	26
Eigene Experimente	27
Besprechung	32
Der Proteinanteil der Cuticula	33
C. <u>Ein Vergleich zwischen der Wildform von <i>Schistocerca</i> und einer Albinomutante</u>	35
<u>Teil II: N-Acetyl-dopamin bei höheren Organismen</u>	37
1. Normaler menschlicher Harn	37
2. Versuche mit Rinder-Nebennieren	37
3. Hemmung der Monoaminoxidase	37

4. Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin und anderer neuer Dopamin-Metaboliten im mensch- lichen Harn beim malignen Phäochromoblastom	38
Besprechung der Ergebnisse	50
5. Pharmakologische Versuche	51
Fälle von gutartigem Phäochromocytom und Besprechung	56
<u>Teil III: Über das Vorkommen der Aminacetylase bei Insekten und Säugetieren</u>	59
<u>Gesamtdiskussion</u>	62
<u>Zusammenfassung</u>	65
<u>Experimenteller Teil</u>	67
Allgemeine Methodik	67
Synthesen	71
Versuchstiere	77
Versuchsbeschreibungen	80
<u>Literatur</u>	121

Einleitung

Ihre größten Erfolge errang die Biochemie - damit auch die theoretische Medizin - als vergleichende Wissenschaft. Die Nucleinsäurechemie, die Biochemie der Vererbung, wurde durch Versuche mit Bakterien und Viren entwickelt (3; 25; 56), die dabei gewonnenen Modellvorstellungen wurden später auf die Zelle im allgemeinen übertragen. Studien über die Pigmentbildung bei Schmetterlingen brachten den ersten Beweis für eine Realisation der Erbinformation durch die Enzymneusynthese (13). Die Isolierung eines Insektenhormons (15) und Arbeiten mit Insektenriesenchromosomen (17) begründeten die Theorie, daß Hormone in diese Realisation eingreifen können (50; 51). Diese neue Vorstellung stützten weitere Untersuchungen der Hormon-Gen-Enzymkette an verschiedenen Insekten (43; 44).

Diese bisherigen Erfolge der vergleichenden Biochemie ermutigten zu neuen Kombinationen. Nicht zuletzt hofft man, durch Untersuchungen an Modellen aus verschiedenen Tierarten einer Lösung des Krebsproblems näherzukommen (10).

Die Vergleiche von Tier zu Tier, mit Vorsicht auch zum Menschen, werden in der Biochemie durch die Tatsache begünstigt, daß viele biochemische Grundreaktionen in den Zellen im wesentlichen gleichartig ablaufen. Zugrunde liegt die recht ähnliche biochem. Ausstattung der verschiedensten Zellen und Zellsysteme. Sogar die Baustoffe zeigen von den Arthropoden aufwärts erstaunliche Übereinstimmungen (siehe auch 46).

Dennoch finden wir gelegentlich einen Funktionswandel mancher Stoffe in verschiedenen Tierklassen. Z.B. dienen Dopamin-Derivate bei den Säugetieren als Hormone (Adrenalin) und Gewebshormone (Noradrenalin, Dopamin). Bei den Insekten stellt ein Dopaminderivat, das N-Acetyl-dopamin, die Sklerotisierungssubstanz dar. Es war daher von Interesse, den Dopamin-Stoffwechsel bei Säugern und Insekten vergleichend zu unter-

suchen, insbesondere im Hinblick auf die N-Acetylierung.

Mechanismus und Bedeutung der N-Acetylierung

Acetylierungen werden im Organismus durch Enzyme bewerkstelligt, die man zu den Transferasen zählen muß. Transacetylierungen, wie wahrscheinlich alle Transacylierungen, benötigen Coenzym A als Cofaktor, das in Zusammenhang mit Studien an einer Arylaminacetylase entdeckt worden ist (60; 61).



Abb. 1 Allgemeines Schema zur Acetylierung

Ein spezieller Fall ist die Acetylierung am Stickstoff. Dabei ist für HX ein Amin zu setzen. Die oben formulierte Reaktion ist dann irreversibel unter physiologischen Bedingungen, wegen des Unterschieds an freier Hydrolysenenergie zwischen Amid- und Alkylmercaptanbindung (21).

a) Ein Entgiftungsmechanismus

Gesichert ist die Bedeutung der N-Acetylierung als Entgiftungsreaktion. Im allgemeinen sind die acetylierten Amine weniger toxisch als die freien Basen.

Dieser Entgiftungsmechanismus gilt vor allem für aromatische Fremdamine, während die Entgiftung niedermolekularer Amine der Schutzfunktion der Monoaminoxidase unterliegt (101).

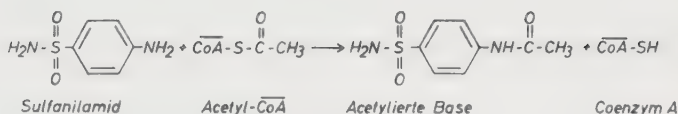


Abb. 2 Entgiftung von Sulfonamiden

Die Stickstoffacetylierung wird nach Gaben von Sulfonamiden als unerwünschte Nebenreaktion beobachtet. Auch wegen der geringeren Löslichkeit der N-Acetylderivate in Wasser können unangenehme Folgen entstehen: Die N-Acetylderivate können im Harntrakt auskristallisieren.

Auch Deacetylierungen sind bekannt geworden (Acetanilid, 11).

b) N-Acetyl-aminofluoren ist als carcinogener Faktor bekannt (19).

c) Physiologische Acetylamine

Glucosamin-6-phosphat und Galaktosamin-6-phosphat werden durch ein Leberenzym acetyliert (16). Die Acetylverbindungen sind Bestandteile der Bindegewebsgrundsubstanzen und des Insektenchitins.

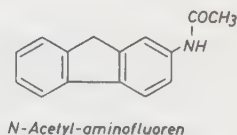


Abb. 3

Bei der Arbeit an Peptidhormonen entdeckten BLOCK und Mitarbeiter acetylierte Aminosäuren (9). Auch im Stoffwechsel von Histamin, wahrscheinlich bei Darmbakterien, scheint die Acetylierung eine gewisse Rolle zu spielen. TABOR et al. isolierten das acetylierte Amin, 4-(-Acetylaminooethyl-)imidazol (95; 96). Der wichtigste Abbauweg für Histamin beim Säugetier besteht jedoch in Methylierung des Ringstickstoffs und Oxydation der Seitenkette (80).

Erst kürzlich wurde N-Acetyl-serotonin isoliert. Es hat keine Wirkung auf die Uterusmuskulatur, im Gegensatz zu Serotonin (66). Nach den Arbeiten von LERNER wird der Metabolit in die Biosynthese von Melatonin eingeordnet, das die Froshaut aufhellt und damit Gegenspieler des Melanocyten-stimulierenden Hormons der Hypophyse ist.

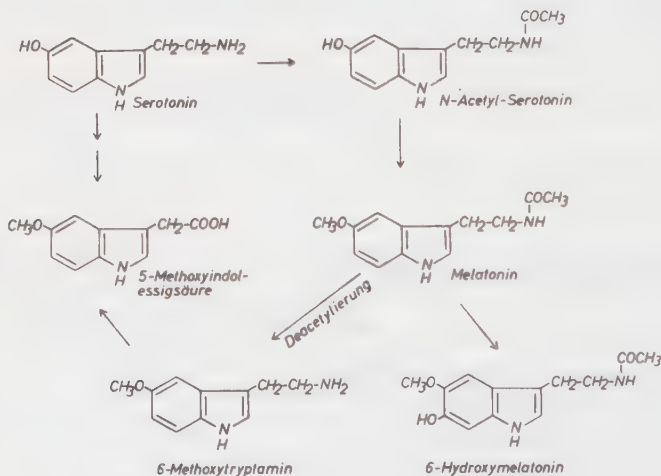


Abb. 4 Biosynthese von Melatonin

Melatonin wirkt auf die Froschhaut schon in Konzentrationen von 10^{-12} g/ml, in denen auch das Melanocyten-stimulierende Hormon wirksam ist. Dieses Hormon besitzt ebenfalls Acetylgruppen an den N-Endgruppen (57; 58).

N-Acetyl-tyramin wurde von BUTENANDT et al. aus *Bombyx mori* isoliert (14). Die Kristalle fielen an bei der Aufarbeitung zur Isolierung des Insektenhormons Ecdyson. Eine pharmakologische Prüfung im Vergleich zu Tyramin ergab eine erheblich verminderte Wirksamkeit.

Die bisher bekannte Inaktivierung beim Menschen läuft über die Oxydation:

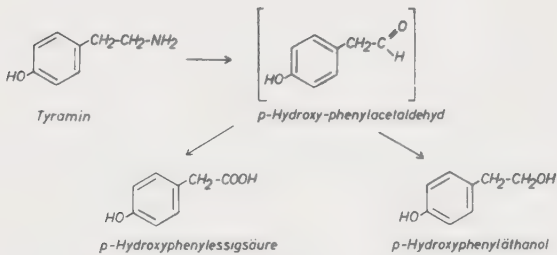


Abb. 5 Inaktivierung von Tyramin beim Menschen

d) N-Acetyl-dopamin

wurde zum ersten Mal beschrieben von KARLSON und SEKERIS (49). Es entsteht bei der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* aus Dopamin durch Acetylierung. Für die Schmeißfliegen hat es seine Bedeutung als sklerotisierendes Agens (48). Zu bestimmten Zeiten wird N-Acetyl-dopamin als Glykosid gespeichert (48; 68). Gleichzeitig mit dieser Arbeit gelang SEKERIS der Nachweis von N-Acetyl-dopamin in *Tenebrio molitor*.

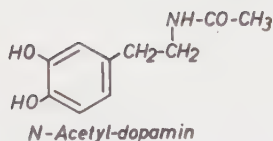


Abb. 6

Reines *N*-Acetyl-dopamin ist ein weißes, kristallines Pulver, das sehr hygroskopisch und luftempfindlich ist. Es ist löslich in Wasser, Äthanol und Methanol, bei Erwärmen auch in Essigester. Es löst nicht in Benzol und Äther.

SEKERIS beobachtete bei Untersuchungen über die Dopa-Decarboxylase ⁺) (83), daß *N*-Acetyl-dopamin das Enzym hemmt. In der Abbildung ist das Ergebnis dieses Hemmversuches kurz dargestellt:

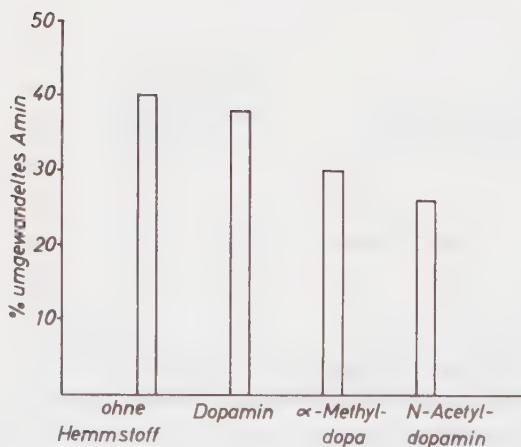


Abb. 7 Hemmung der Dopa-Decarboxylase. Inkubationen eines Enzympräparats mit verschiedenen Hemmstoffen und Substrat. Der prozentuale Anteil entstandenen Dopamins an der wiedergefundenen Aktivität ist radiochromatographisch ermittelt worden.

⁺) EC 4.1.1.26; 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin-carboxy-Lyase

Ziel der Arbeit

Im Rahmen der Arbeiten über die Sklerotisierung der Insekten-Cuticula - eine der physiologischen Wirkungen des Metamorphosehormons Ecdyson - war es von Interesse, festzustellen, ob N-Acetyl-dopamin bei Insekten ubiquitär verbreitet ist. Die vergleichende Untersuchung sollte jedoch über die Klasse der Insekten hinaus auf Wirbeltiere und auf den Menschen ausgedehnt werden. Wie unten gezeigt wird, ergaben sich dabei interessante Beziehungen zu bestimmten klinischen Formen des Phäochromocytoms.

Eigene Ergebnisse

Teil I: N-Acetyl-dopamin bei Insekten

A. Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin als Tyrosinmetabolit

Als aromatische Verbindung geht das N-Acetyl-dopamin aus dem Tyrosin hervor. Der Tyrosinstoffwechsel liefert diejenigen Phenole, von denen man annimmt, daß sie für die Härtung der Cuticula verantwortlich sind. Bei Calliphora wird N-Acetyl-dopamin in die Cuticula eingebaut.

Spielt N-Acetyl-dopamin auch bei anderen Insekten eine Rolle? Zur Beantwortung dieser Frage wurde versucht, Einblick in den Stoffwechsel des Tyrosins zu bekommen und die Metaboliten zu charakterisieren.

1) Über den Tyrosinstoffwechsel und das Vorkommen von N-Acetyl-dopamin bei Drosophila melanogaster

Die Schwierigkeit bestand darin, aus den winzigen Larven genügend Material zum Nachweis zu gewinnen.

Drosophila ist mit Calliphora relativ nahe verwandt. Es ist wahrscheinlich, daß mit dem ähnlichen Entwicklungsgang auch der Stoffwechsel Gemeinsamkeiten aufweist.

In der Tat traten nach Verfütterung von radioaktivem Tyrosin die gleichen Umwandlungsprodukte auf, die bei Calliphora gefunden wurden. Es gelang, N-Acetyl-tyramin nachzuweisen und das Vorkommen von N-Acetyl-dopamin sehr wahrscheinlich zu machen. Dadurch ist eine Stütze für die Annahme gegeben, daß N-Acetyl-dopamin analog zu Calliphora Bedeutung für die Sklerotisierung hat.

Eine Reihe von Mutanten, die sich in Ausbildung und Farbe

der Cuticula unterscheiden (Merkmalsbezeichnungen: wild, ebony, yellow, bw/bw e/e, dp/b dp/b, ltr balanciert), wurde auf Dopa-Decarboxylaseaktivität untersucht. Dieses Enzym liefert das Amin, dessen Acetylderivat in die Cuticula eingebaut werden soll.

In allen Stadien war die Decarboxylaseaktivität sehr hoch. Relativ am geringsten war die Aktivität der Puppen. Zwischen den einzelnen Mutanten ergaben sich aber keine Unterschiede in der Aktivität dieses Enzyms; die unterschiedlichen Cuticulamerkmale sind nicht an die Decarboxylase und den davon abhängigen Stoffwechsel gebunden.

2) Schistocerca gregaria (Forskal)

Die Heuschrecken haben einen längeren und komplizierteren Entwicklungszyclus als Calliphora. Sie verpuppen nicht, die Larvencuticula ist gehärtet, die 5 larvalen Stadien sind schon imagoähnlich, nur im Farbmuster verschieden.

Zuerst wurden die einzelnen Metaboliten des Tyrosinstoffwechsels untersucht.

a) Vorkommen und Biosynthese von N-Acetyl-tyramin und N-Acetyl-dopamin

In Gesamthomogenaten von einzelnen Tieren konnte N-Acetyl-tyramin chromatographisch nachgewiesen werden.

Von mehreren Chromatogrammen wurde ein Fleck eluiert, der mit Diazoreagens bei $R_f = 0,85 - 0,95$ in Butanol-Eisessig-Wasser (abgekürzt = System I) lokalisiert worden war. Phenolische Säuren desselben R_f -Werts wurden durch Elektrophorese abgetrennt und die am Start verbliebene Komponente (mit Diazoreagens orange-rot) eluiert, die UV-Maxima zu 202 und 273 m μ festgestellt und hydrolysiert. In der folgenden Elektrophorese wanderte der Fleck nun wie Tyramin. Ebenso fielen

die Färbungen (Ninhydrin +, Diazoreagens orange-rot, keine Reduktion von Eisencyanid) aus.

In Gesamthomogenaten von Heuschrecken, denen vorher Tyrosin-generell- C^{14} bzw. Dopa-2- C^{14} injiziert worden war, wurde N-Acetyl-dopamin als Umwandlungsprodukt gefunden.

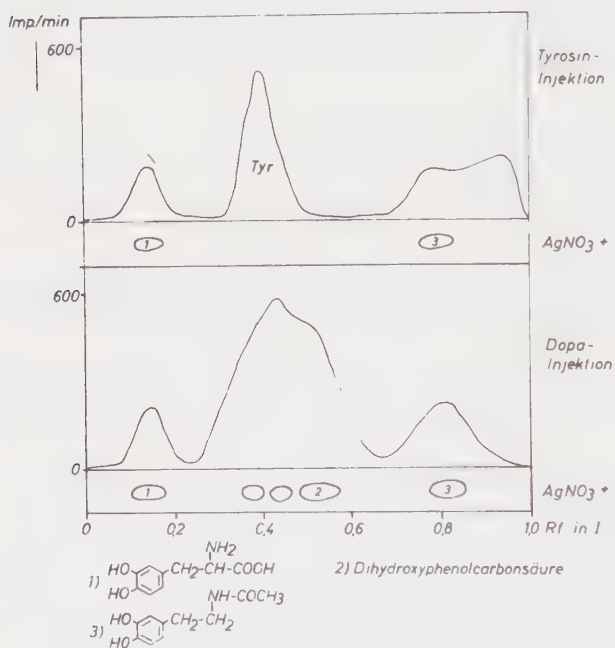


Abb. 8 Umwandlungen von aktivem Tyrosin bzw. Dopa in Larven des 5. Stadiums (chromatographische Auftrennung)

Die Chromatogramme wurden mit Silbernitrat entwickelt. Der Fleck bei 0,75 bzw. 0,8 färbte auch mit Diazoreagens. Das Eluat wurde hydrolysiert (mit 5 n HCl 4 Std. im Rückfluß) und im Hydrolysat eine nach der Kathode wandernde (pH 6,8) Substanz gefunden, die Brenzkatechinaminfärbungen gab. Im System I hatte sie einen Rf-Wert von 0,4 - Eigenschaften, die Dopamin entsprachen.

N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-tyramin spielen also auch bei Schistocerca eine Rolle. Durch die Versuche mit aktivem Material ist gezeigt, daß die beiden Metaboliten dem Tyrosinstoffwechsel entstammen. Der Syntheseweg läuft über Dopa zum N-Acetyl-dopamin. - Die übrigen Metaboliten siehe Abschnitt b)!

Liegt hier ein spezifischer Weg des Tyrosinstoffwechsels vor?

Lokalisation in der Epidermis:

Es ist kürzlich durch KARLSON und SEKERIS bewiesen worden, daß die Dopa-Decarboxylase in den Epidermiszellen ihren Aktionsort hat (47). Dort sollten also auch die Amine und ihre N-Acetyl-Derivate nachweisbar sein.

Deshalb wurde bei einer Gruppe von Schistocerca-Larven, die vor oder in der letzten Häutung standen, Epidermis + Cuticula vorsichtig vom Inneren (Fettkörper, Darm usw.) freipräpariert und beide Teile getrennt homogenisiert. In der Epidermis waren Tyramin, Dopamin, N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-tyramin vorhanden, während im Homogenat des Inneren weder die freien noch die acetylierten Amine gefunden wurden.

Ein Zusammenhang der N-Acetyl-dopamin-Produktion mit der Sklerotisierung ist damit recht wahrscheinlich. Dieses Problem wird später nochmals aufgegriffen.

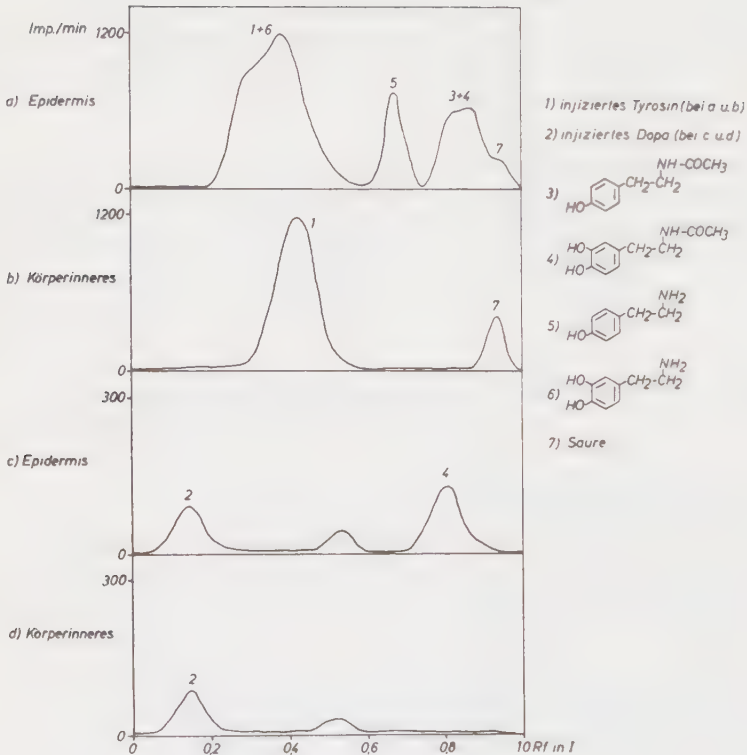


Abb. 9 Übersicht über die Umwandlungen von Tyrosin und Dopa in der Epidermis und im Inneren (Radiochromatogramme).

In welchem Zusammenhang steht dieser Acetylierungsweg bei *Schistocerca*? Gibt es noch weitere Acetylamine? Um das Vorkommen der N-Acetyllderivate im Zusammenhang des Tyrosinstoffwechsels und der Entwicklung der Heuschrecken sehen

zu können, sollen die anderen Metaboliten untersucht werden.

b) Der katabolische Stoffwechsel von Tyrosin

KARLSON und SEKERIS (49) untersuchten den Abbau von Tyrosin bei *Calliphora erythrocephala* und konnten p-Hydroxyphenylpropionsäure als Abbauprodukt identifizieren. Der weitere Abbau ist noch nicht bekannt.

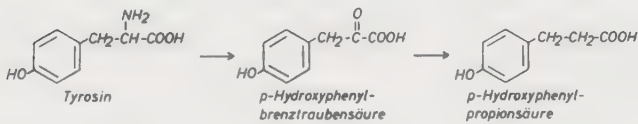


Abb. 10 Abbau von Tyrosin bei *Calliphora erythrocephala*

Bei *Schistocerca* ließen sich papierchromatographisch mehr Metaboliten von Tyrosin ^{+) aufzeigen als bei *Calliphora*. Es sollte versucht werden, möglichst viele davon zu identifizieren.}

Die Eigenschaften und das Vorkommen der Metaboliten sind in den Tabellen I bis IV zusammengefaßt.

Aus Tyrosin-generell- C^{14} entstandene Produkte:

Regelmäßig ließ sich Dopa auffinden, das Decarboxylierungsprodukt Dopamin jedoch sehr selten in den Gesamthomogenaten. Wie oben beschrieben, treten die Amine in der Epidermis auf. Es ist anzunehmen, daß die Aktivität bei Gesamthomogenisationen untergeht und von anderen Metaboliten überlagert wird.

Tyramin konnte mehrmals gefunden werden.

Ein Gemisch von Metaboliten, die in der Elektrophorese nicht wanderten, hatte den R_f -Wert 0,7 bis 0,8 in System I.

^{+) Freies Tyrosin kommt in großer Menge vor; auch freies Histidin konnte regelmäßig gefunden werden, dessen Aufgabe bei Insekten nach LIMPEL und CASIDA im Jodstoffwechsel liegen soll (59).}

Gleichen Rf-Wert mit dem Gemisch hatten N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-tyramin.

Unter den Metaboliten war ein p-substituiertes Monophenol, das in fast allen Homogenaten auftrat.

Es war nicht hydrolysierbar. Die UV-Maxima lagen bei 205 und 266 m μ , dem Monophenol entsprechend. Die Struktur lie β sich noch nicht weiter aufkl $\ddot{a}$ ren.

Ein anderes Bestandteil dieses Gemisches wurde aus dem Homogenat einer Imago der Albinomutante isoliert. Dabei handelte es sich um einen Ester einer aromatischen Verbindung mit einer aliphatischen S $\ddot{a}$ ure. Beide Bruchst $\ddot{u}$ cke waren C¹⁴-markiert, also aus Tyrosin entstanden.

Es wurden einige phenolische S $\ddot{a}$ uren gefunden. Die Eigenschaften dieser S $\ddot{a}$ uren sprechen f $\ddot{u}$ r das Vorliegen von p-Hydroxyphenyllessigs $\ddot{a}$ ure und p-Oxybenzoes $\ddot{a}$ ure sowie einer aromatischen S $\ddot{a}$ ure, die mit keiner der gepr $\ddot{u}$ ften identisch war.

Der Kot dieser Versuchstiere wurde getrennt untersucht, um einen Anhalt zu bekommen, welche dieser Metaboliten eindeutig als Ausscheidungsprodukte und damit zum katabolischen Stoffwechsel zu rechnen sind.

Im Kot dieser mit Tyrosin-generell-C¹⁴ injizierten Tiere fand sich Tyramin, p-Hydroxyphenylbrenztraubens $\ddot{a}$ ure, p-Oxybenzoes $\ddot{a}$ ure und eine weitere phenolische S $\ddot{a}$ ure.

Zwei bei pH 6,8 ungeladene Substanzen, ebenfalls - wie diejenigen aus dem Inneren - mit dem Rf-Wert 0,7, wurden in ihrer Struktur nicht aufgekl $\ddot{a}$ rt.

Injektionen von Dopa-2-C¹⁴:

Der Weg der Hydroxylierung zu Dopa ist in der Hauptsache ein anabolischer, zur Bildung von Melaninen, H $\ddot{a}$ rtungsphenolen f $\ddot{u}$ r die Cuticula u.a. Teilweise werden aber auch Diphenole ausgeschieden.

Als Metaboliten von Dopa traten auf: Dopamin, N-Acetyl-

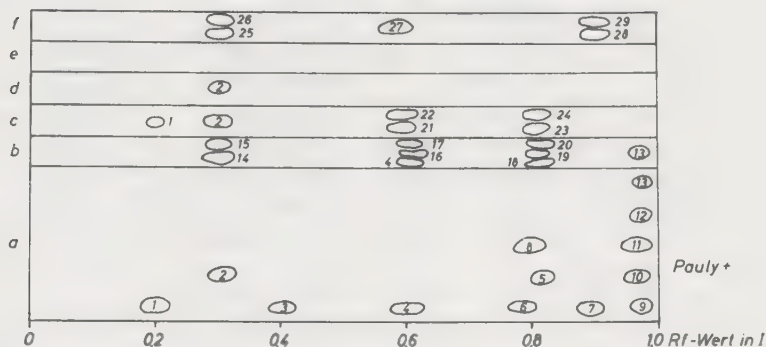


Abb. 11. Hypothetisches Chromatogramm.
 Rf-Werte und Numerierung aller bei *Schistocerca*
 gefundenen Metaboliten.
 a: nach Tyrosininjektion im Körperinneren
 b: nach Tyrosininjektion im Kot
 c: nach Dopainjektion im Körperinneren
 d: nach Dopainjektion im Kot
 e: nach p-Hydroxyphenylpropionsäure-Injektion
 im Körperinneren
 f: nach p-Hydroxyphenylpropionsäure-Injektion
 im Kot

dopamin, zwei Diphenolcarbonsäuren, ein weiteres Amin und eine in der Elektrophorese bei pH 6,8 nicht wandernde Substanz, die nicht spaltbar war. Wird nach Dopainjektion nur die Hämolymphe untersucht, ist letztgenannte Substanz einziger Metabolit. Die übrigen werden also intracellulär gebildet.

Dopamin war auch im Kot der Tiere nachweisbar.

Injektionen mit p-Hydroxyphenylpropionsäure-generell- C^{14} :
 p-Hydroxyphenylpropionsäure müßte Zwischenprodukt im

Tabelle I. Eigenschaften ⁺⁾ der Metaboliten nach Injektion aktiven Tyrosins

Nr. (aus Abb.11)	Rf-Wert in I	Elektrophoret. Ladung b. pH 6,8	UV-Maxima (mp)	weitere Kriterien ⁺⁾	Resultat
1	0,2	Ø		Färbg.; Rf-Werte	Dopa
2	0,3	+		Färbg.; Rf-Werte	Dopamin
3	0,4	Ø	260	Färbungen	injiziert. Tyrosin
4	0,6-0,7	+	275; 210	Färbg.; Rf-Werte	Tyramin
6	0,7-0,8	Ø	266; 205	Färbg.; Rf-Werte; blaue Fluoreszenz	Monophenol
7	0,8		265 ?	Hydrolyse (7a; 7b)	Ester
7a	0,35	Ø	256	Pauly: orange	
7b	0,45	-	kein Max.	Pauly neg.	nicht aromatisch
8	0,8		275; 207	Färbg., Absorption, Hydrolyse (8a)	N-Acetyl-dopamin
8a	0,45(HCl)	+		Färbg., Absorpt.	Dopamin
9	0,85-0,95	Ø	273; 202	Färbg., Hydrolyse (9a)	N-Acetyl-tyramin
9a	0,65			Pauly orange	Tyramin
11	0,9	-		Rf-Werte, Färbg.	p-Hydroxyphenyl-essigsäure
12	0,9	-		Rf-Werte	
13	0,95	-	251	Pauly gelb	p-Hydroxybenzoesäure
im Kot:					
14	0,3	Ø	252	Pauly pos.	
15	0,3-0,4	-	282		
16	0,6	Ø		Pauly pos.	identisch mit 6 ?
17	0,63	-		Färbg.; Rf-Werte	
4	0,6-0,7	+	275	Färbg.; Rf-Werte	Tyramin
18	0,8	-	290	Pauly gelb-orang. Rf-Werte, graue Fluoreszenz	p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure
19	0,8	Ø		Pauly: orangerot	
20	0,8	+		Pauly neg.	
13	0,95	-	251	Pauly: leuchtend gelb	p-Hydroxybenzoesäure

⁺⁾ Weitere Eigenschaften siehe Methodischer Teil!

Tabelle II. Eigenschaften ⁺) der Umwandlungsprodukte von Dopa

Nr.	Rf-Wert in I	Ladung bei pH 6,8	UV-Max. (mμ)	weitere Kriterien ⁺)	Resultat
2	0,3	+		Färbungen	Dopamin
21	0,6	-	287	AgNO ₃ pos.	
22	0,5-0,6	8	270	Färbungen	
23	0,8	-		AgNO ₃ pos.	
24	0,8	+		AgNO ₃ pos.	
8	0,8	8		Hydrolyse, AgNO ₃ pos.	N-Acetyl- dopamin

Tabelle III. Eigenschaften ⁺) der Umwandlungsprodukte von
p-Hydroxyphenylpropionsäure

Nr.	Rf-Wert in I	Ladung bei pH 6,8	UV-Max. (mμ)	weitere Kriterien ⁺)	Resultat
Im Kot:					
25	0,3-0,4	(+)		Pauly pos.	Transaminierung ?
26	0,3-0,4	(-)	286	Pauly pos.	
27	0,6	-	240	Rf-Werte	
28	0,90	8	?		Decarboxylierung ?
29	0,90	-		Rf-Werte	p-Hydroxyphenyl- propionsäure (Inj.)

⁺) Weitere Eigenschaften siehe Methodischen Teil!

Tabelle IV. Vorkommen der einzelnen Metaboliten

Metabolit	im Körperinneren		nach p-Hydroxy-phenyl-propion-säure (C ¹⁴)	im Kot		nach p-Hydroxy-phenyl-propion-säure (C ¹⁴)	
	nach Tyr. (C ¹⁴)	nach Dopa(C ¹⁴)		nach Tyr. (C ¹⁴)	nach Dopa(C ¹⁴)		
Dopamin	+	+			+	?	
Tyramin	+			+			
N-Acetyl-tyramin	+						
N-Acetyl-dopamin	+	+					
p-Hydroxy-phenyl-propionsäure	+	?				+	
p-Hydroxy-benzoesäure	+			+		+	?
Dopa	+	+					
p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure	+	?		+			

Tyrosinabbau sein. Sie verschwindet auch in wenigen Stunden aus dem Heuschreckeninneren und findet sich in den Exkrementen zum Teil unverändert (Abb. 53 im exptl. Teil!). Erstaunlicherweise entstand zudem wiederum ein nicht geladener Metabolit (in der Elektrophorese bei pH 6,8), Rf-Wert in I = 0,85. Zwei entstandene phenolische Carbonsäuren wurden mit allen Verbindungen, die aus enzymatischen Gründen in Frage kamen, verglichen, jedoch ohne Erfolg.

c) Schema des Tyrosinstoffwechsels bei Schistocerca gregaria

Nach den vorstehenden Ergebnissen können zwei Gruppen von Metaboliten unterschieden werden:

Solche, die dem spezifischen Weg zu N-Acetyl-dopamin dienen, und Produkte, die dem Tyrosinabbau entstammen; ferner einige Verbindungen, die eine Einordnung noch nicht erlauben.

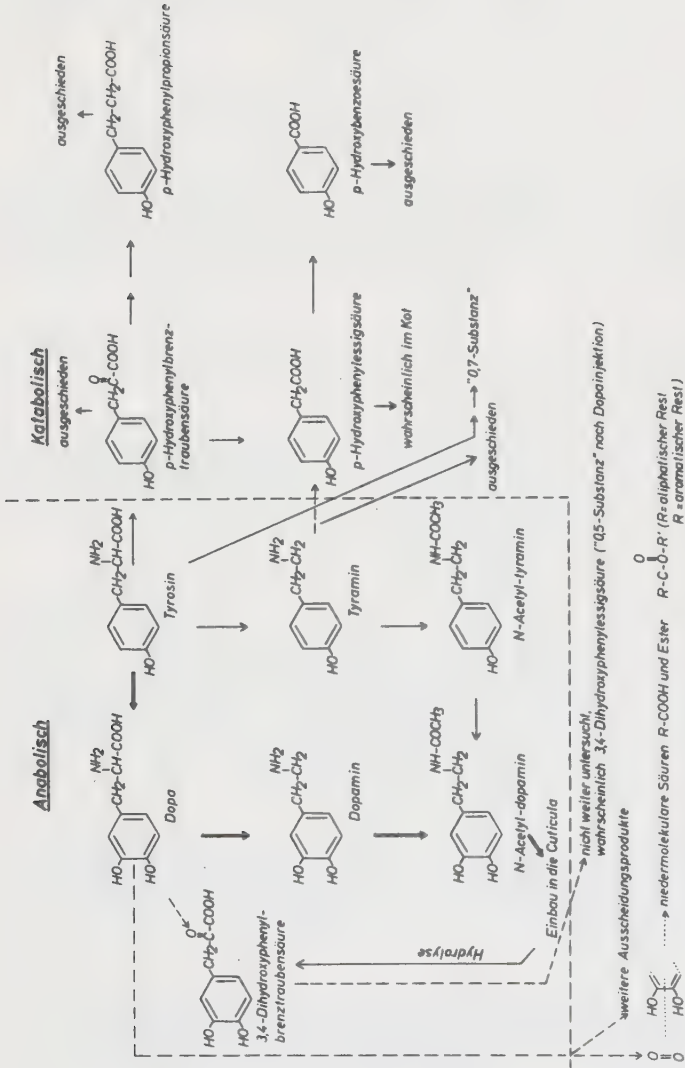


Abb. 12 Schema des Tyrosinstoffwechsels bei *Schistocerca gregaria*

Zum Abbau kann die Gruppe der Phenolcarbonsäuren gerechnet werden; im Schema sind sie geordnet, wie es die bekannten enzymatischen Reaktionsmöglichkeiten zulassen. In den Sklerotisations-Stoffwechsel ist auch ein Befund aus späteren Versuchen mit Cuticula eingetragen.

d) Der Tyrosin-Stoffwechsel in der larvalen Entwicklung

Die vorstehenden Versuche beschrieben die möglichen Umwandlungen von Tyrosin. Es ist die Frage offen, welchen Änderungen der Stoffwechsel im Ablauf der morphologischen Entwicklung unterworfen ist.

Die einfache chromatographische Auftrennung des Gesamthomogenats läßt verschiedene Überlagerungen im Rf-Wert zustande kommen. Deshalb konnten aus den I n j e k t i o n s v e r s u c h e n zunächst keine eindeutigen Vergleiche gezogen werden. Erst die große Versuchszahl (200 Tyrosininjektionen) gewährte mehr Sicherheit und ergab folgenden Zusammenhang mit der morphologischen Entwicklung:

Die Abbauprodukte von Tyrosin traten zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung auf, ebenso die oben beschriebene "0,7 - Substanz" (die vielleicht auch dem Abbau angehört). Auch die Ausscheidungsprodukte im Kot waren sehr konstant nachweisbar. Nur die Amine und Acetylamine unterlagen Schwankungen. Sie waren besonders zur Zeit von Häutungen nachweisbar.

In der folgenden Abbildung sind die Chromatogramme der Versuche mit verschiedenen Entwicklungsstadien nebeneinander gestellt:

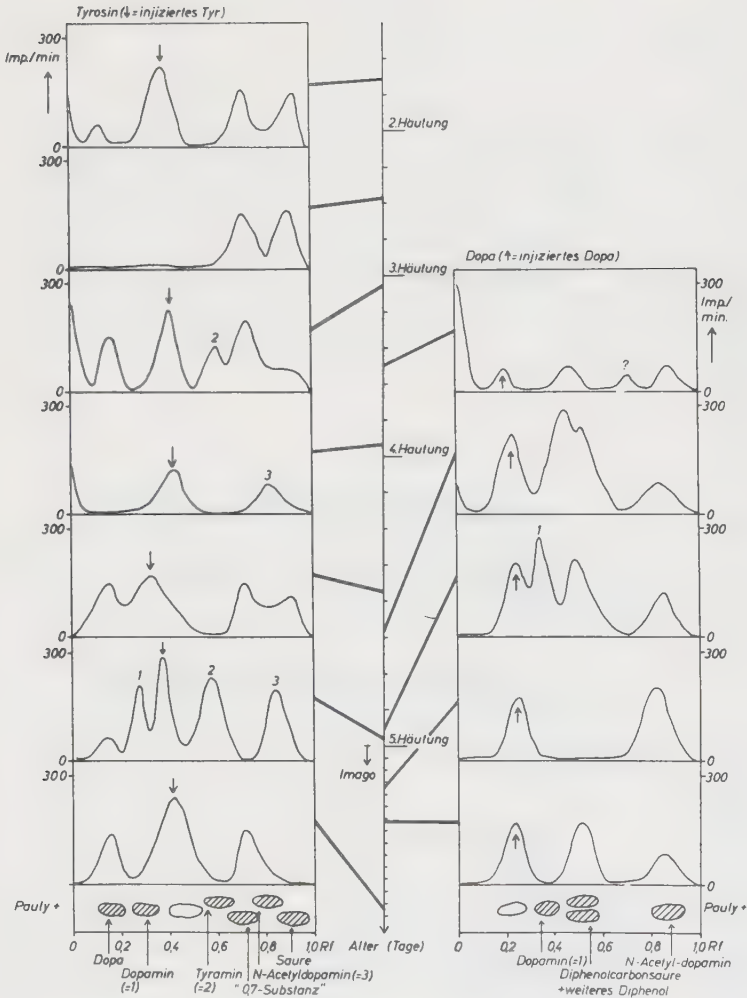


Abb. 13 Gesamthomogenate von Schistocerca-Larven und -Imagines verschiedenen Alters. Übersicht über die Umwandlungen von Tyrosin und Dopa anhand der Radiopapierchromatogramme

Mehr Aussagekraft haben die Beobachtungen der zeitlichen Maxima der **D e c a r b o x y l a s e** und **A m i n o x y - d a s e**, also der Enzyme, die für die Rhythmik im Auftreten der Amine verantwortlich sind.

Während der Entwicklung der Heuschrecken treten mehrere Aktivitätsmaxima der Enzyme auf. Das Enzympräparat aus der Zeit eines Maximums vermag den größten Teil des zugesetzten Substrats zum Amin zu decarboxylieren. Nach einem Maximum der Decarboxylierung tritt ^{das} transaminierte ^{+) oder oxydierte} Produkt immer mehr in den Vordergrund und bleibt als einziges Umwandlungsprodukt in der Zeit eines Decarboxylierungsminimums übrig (Abb. 14). Die beiden Enzymaktivitäten zeigen gegenläufige Kurven.

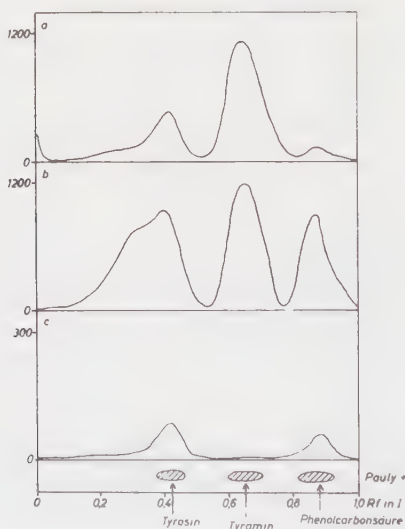


Abb.14 Decarboxylase- und Transaminase-Aktivität bei Heuschrecken verschiedenen Alters. Tyr-¹⁴C wurde mit Gesamthomogenaten inkubiert (Bedingungen siehe Versuchsteil!) und die Umwandlungsprodukte radiopapierchromatographisch identifiziert.
a) 4 Tage alte Imagines, viel Tyramin
b) 10 Tage alte Imagines, Tyramin + Phenolcarbonsäure
c) 16 Tage alte Imagines, die Säure ist einziges Umwandlungsprodukt

+) siehe S.

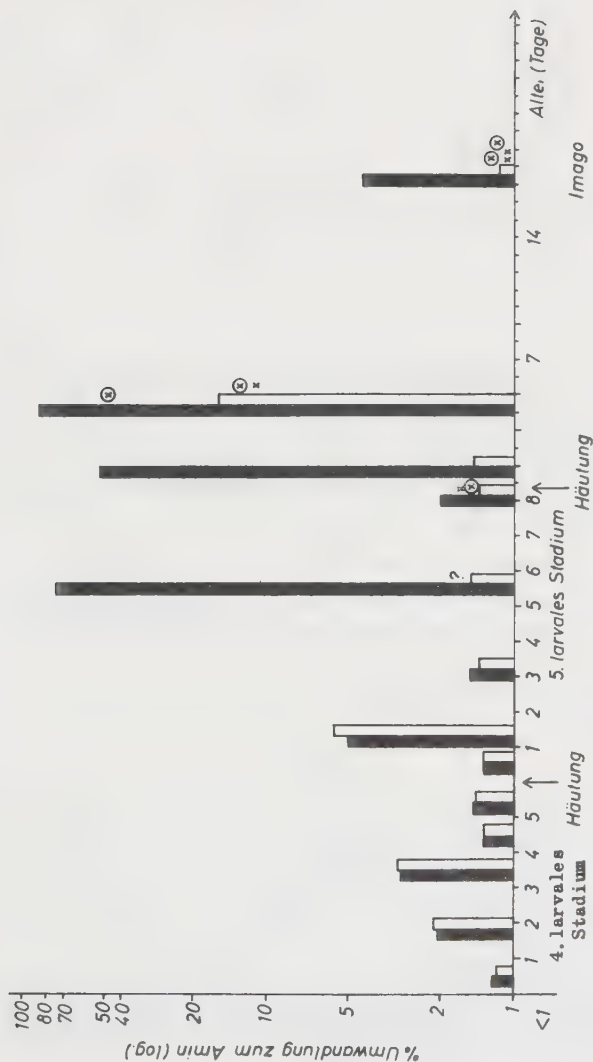


Abb. 15. Ergebnisse der Inkubationsreihe; Enzympräparate verschiedenen larvalen Alters wurden mit Substrat inkubiert und die Menge entstandenen Umwandlungsprodukts radiopapierchromatographisch gemessen. Ausgefüllte Säulen geben den prozentualen Anteil entstandenen Tyramins (Substrat Tyrosin) an wiedergefundener Gesamtaktivität an, weiße Säulen Dopamin (Substrat = Dopa) $\otimes$ bzw. $\times$ sind entsprechende Einzelinkubationen, die, weil nicht zugehörig zur gleichen Inkubationsreihe, nicht quantitativ vergleichbar sind. - Tyrosin wird stärker als Dopa decarboxyliert.

Der Stoffwechsel der Heuschrecken stellt also immer vor der Häutung Amine bereit. Nach der Häutung erreicht die Decarboxylaseaktivität nochmals ein Maximum. Schematisch dargestellt:

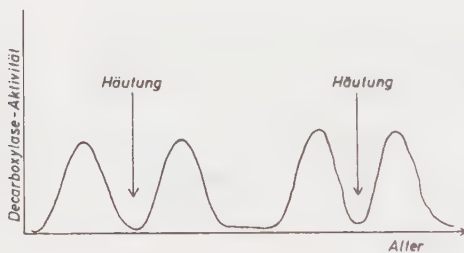


Abb. 16 Schema zu Abb. 15

Die Maxima der Aminoxydase liegen genau entgegengesetzt.

Diese Stoffwechselwege stehen offenbar in Beziehung zu den morphologischen Änderungen, d.h. der Häutung. Sie sind für die Sklerotisierung wichtig, wie im nächsten Abschnitt ausführlich gezeigt wird.

Diesen Zusammenhang hat SEKERIS schon für *Calliphora erythrocephala* aufgedeckt (85), bei welcher eine zweigipflige Kurve der Decarboxylierungs-Aktivität vorliegt:

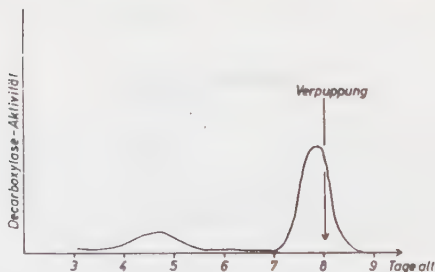


Abb. 17 Zeitliche Einordnung der Decarboxylierungsmaxima bei *Calliphora erythrocephala* (schematisch), aus Inkubationen mit Enzympräparaten verschiedenen Larvenalters gewonnen, wie oben. Die zweite Spitze kann eindeutig auf die Häutung des Puppentönnchens bezogen werden.

Besprechung

Die Bedeutung von Tyrosin für die Heuschreckenlarve muß eine mehrfache sein: Tyrosin wird in das reichlich neugebildete Eiweiß eingebaut; Melanine werden synthetisiert und, wie hier gezeigt, die aromatischen Amine geliefert. Das überschüssige Tyrosin wird immer abgebaut. In den Perioden, in denen vermehrt die anderen Wege aktiviert werden, bleibt kein Substrat für den Abbau übrig. Die Perioden, in denen Amine gebildet werden, also vor und nach der Häutung, entsprechen sehr wahrscheinlich den Zeiten des Bedarfs für die Sklerotisierung. Das relative Decarboxylierungsminimum während der Häutung könnte zwei Gründe haben; es liegt eine Hemmung vor für die Zeit, in der die Epidermis das Abstreifen der alten Cuticula vorbereitet, die Amine dienen der Härtung der frischen Cuticula; oder die Amine erfüllen zwei zeitlich verschiedene Aufgaben. Die erste Interpretation würde verlangen, daß die Härtung erst 2 Wochen nach der letzten Häutung (zur imago) abgeschlossen ist. Schließlich besteht die Möglichkeit, daß Amine auch pharmakologisch Bedeutung bei Insekten haben (Einleitung der Häutungsbewegung).

Zusammenfassend:

Die untersuchten Enzyme sind besonders aktiv in der Zeit vor und nach einer Häutung. Auch in vivo wurden die Acetylamine zur Zeit der Häutung nachweisbar.

Aus diesen Beziehungen ergibt sich die Frage, ob die untersuchten biochemischen Vorgänge mit den morphologischen kausal verknüpft sind. Deshalb soll die Cuticula und ihr Stoffwechsel untersucht werden.

B. Beobachtungen über die Sklerotisierung der Insekten- cuticula. Der Stoffwechsel der Cuticula.

Der Begriff der Sklerotisierung

Die Arthropoden besitzen kein Innenskelett, das aus dem Mesoderm hervorgegangen ist, sondern tragen eine gehärtete Haut, die Cuticula, ektodermalen Ursprungs. Wie die Haut und Hautorgane der Säugetiere hat sie eine Reihe von Schutz-
aufgaben. Zusätzlich dient sie den Muskeln als Angriffsort.

Die frisch geschlüpfte oder gehäutete Larve ist zunächst ganz weich, je nach Entwicklungsgang verschieden lang; bei den Holometabolen bis zur Verpuppung (*Drosophila melanogaster*, *Calliphora erythrocephala*), bei den Hemimetabolen (*Schistocerca gregaria*) wird sie nach einigen Minuten bis wenigen Stunden hart. Mit der Härtung ist häufig eine Farbintensivierung verbunden.

Für diese Härtung ist eine mehr oder weniger definierte Schicht der Cuticula verantwortlich. Die Schichten werden von A. GLENN RICHARDS folgendermaßen schematisiert (76): Wir durchdringen von außen zunächst eine Wachs- und Lipoproteidschicht, wichtig für den Schutz gegen Austrocknung. Nach innen schließt die eigentliche Cuticula an, die aus Chitin und Protein besteht. Sie kennt wieder verschiedene Schichten, der äußerste Anteil ist verhärtet oder "sklerotisiert".

Diese Sklerotisierungen sind in der Entwicklungszeit der Insekten besonders bedeutsam. Das Außenskelett muß dem Wachstum gemäß angepaßt werden, wird deshalb erneuert und wieder sklerotisiert. Die Ruhepuppe erhält eine feste Hülle.

Die indirekte Abhängigkeit des Sklerotisierungsprozesses vom Metamorphosehormon Ecdyson wurde von KARLSON und SEKERIS bewiesen (7; 15; 48; 75).

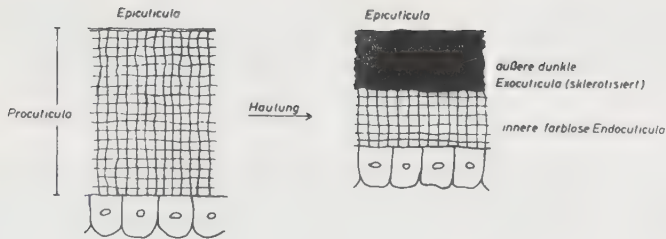


Abb. 18 Insektencuticula vor und nach Härtung (schematisch) (26)

Unsere augenblicklichen Vorstellungen vom Vorgang der Sklerotisierung sind die einer Chinongerbung. Die Chinone entstammen dem Tyrosinstoffwechsel. Als letztes lösliches Produkt der Tyrosinmetaboliten, die in die Cuticula von *Calliphora erythrocephala* eingebaut werden, haben KARLSON und SEKERIS N-Acetyl-dopamin nachgewiesen (48). KARLSON und AMMON zeigten, daß auch die Acetylgruppe in die Cuticula eingebaut wird (42).

Eigene Experimente

Frage 1: Ist N-Acetyl-dopamin das zur Härtung wichtige Phenol? Haben die geschilderten Enzymaktivitäten der Heuschreckenentwicklung etwas mit der Härtung zu tun?

Bei *Calliphora erythrocephala* ist der Einbau des intakten N-Acetyl-dopamin in die Cuticula gesichert (42). Ein weiterer Beweis dafür wurde gefunden durch Einbauversuche mit Tyrosin-Carboxyl- C^{14} . Wird *Calliphoral*arven Tyrosin-generell- C^{14} injiziert und nach der Verpuppung die Verteilung geprüft, findet man 70 bis 80 % in der Cuticula; ist es richtig, daß das aktive Material als Tyrosinmetabolit N-Acetyl-

dopamin in die Cuticula eingebaut wird, muß der obige Versuch mit Tyrosin-Carboxyl- C^{14} negativ ausfallen; denn das aktive C-Atom würde durch Decarboxylierung eliminiert werden.

Dies ist auch wirklich der Fall. Nur 10 % der eingesetzten Aktivität konnten wiedergefunden werden, zu genau gleichen Teilen in Cuticula und Innerem (Exp. Daten S. 96). Auch bei Berücksichtigung eines Verlustes bei der Messung ist dieser Prozentsatz gering und dürfte dem Tyrosineinbau in die Proteine entsprechen.

Aus den Angaben von KARLSON und SCHLOSSEBERGER-RALCKE (45) ist bekannt, daß Tyrosin und Dopa in die Cuticula von Schistocerca eingebaut werden, also eines der beiden Aromaten oder Folgeprodukte gebraucht werden für den Cuticulaaufbau. Da auch Tyrosin unverändert in die Cuticula-Proteine eingebaut wird, kann dieser Befund noch nicht als voller Beweis gelten (siehe auch unten). Deshalb wurden Einbauversuche mit Tyramin-2- C^{14} gemacht. Einbauversuche mit p-Hydroxyphenylpropionsäure-generell- C^{14} sollten zeigen, ob auch eine der im Heuschreckeninneren reichlich vorhandenen Säuren in der Cuticula wieder gefunden werden kann. Die Ergebnisse sind in Tab. V angegeben.

Tabelle V. Einbauversuche in die Cuticula von *Schistocerca*⁺⁾

Injiziert	Wiedergef. Aktivität in der Cuticula Imp/Min x mg		Anteil der Cuticula an wiedergef. Gesamtaktiv.	Alter der Tiere
Tyramin-2- C^{14}	70	75	89 % 85 %	letzte Häutung
p-Hydroxyphenylpropionsäure-gen.- C^{14}	13		nicht mehr auswertbar	"
Tryptophan-2- C^{14}	41	30	etwa 20-50%	"

⁺⁾ Da die biologische Variation in der Entwicklung der Heuschrecken erheblich ist (siehe auch 81), ist eine genau quantitative Messung des Einbaus nicht möglich. Deshalb darf den Zahlen der Tabelle nur eine qualitative Aussage zugebilligt werden.

Es kann festgestellt werden, daß Tyramin in die Cuticula eingebaut wird, p-Hydroxyphenylpropionsäure dagegen nicht (gemessen aus der Differenz der wiedergefundenen Aktivitäten in Cuticula und Innerem). Tryptophan erscheint nur in der Masse, wie es zum Aufbau der Proteine benötigt wird.

Die Bedeutung der Decarboxylierung zu Aminen und der Acetylierung ist also für *Calliphora* und *Schistocerca* die von sklerotisierenden Agentien (Die Resultate S. 11 hatten dies ja schon plausibel gemacht).

Frage 2: Ist der Vorgang der Häutung bei den untersuchten Insekten vergleichbar?

Damit wäre gleichzeitig die Frage nach dem Mechanismus gestellt. Dieses schwierige Problem soll hier nicht umfassend untersucht werden; es sollen nur einige Beobachtungen beschrieben werden, die einen Vergleichsgedanken aufdrängen. Werden Cuticeln von Calliphorapuppen, in die in vivo Tyrosin-generell- C^{14} eingebaut worden war, hydrolysiert, kann papierchromatographisch eine Reihe von aktiven Bruchstücken nachgewiesen werden. Darunter waren auch Tyrosin (Proteine!), Dopamin sowie nichtaromatische Säuren. Cuticeln, die "eingebautes" Dopamin-2- C^{14} enthielten, ergaben bei der Hydrolyse keine der Säuren. Die Säuren müssen also aus dem Teil des eingebauten Moleküls stammen, der nicht markiert war: dem Ring. Die Hydrolyse bewirkt also eine Ringsprengung.

Hydrolysen gleicher Art von Heuschreckencuticeln oder -exuvien (C^{14} -aktiv nach Einbau von Tyrosin-generell- C^{14}) ergaben ein ganz anderes Bild von aktiven Bruchstücken. Die identifizierten Verbindungen sind in der Abbildung notiert, sowie ihre prozentuale Verteilung (Eigenschaften: Tab. VI).

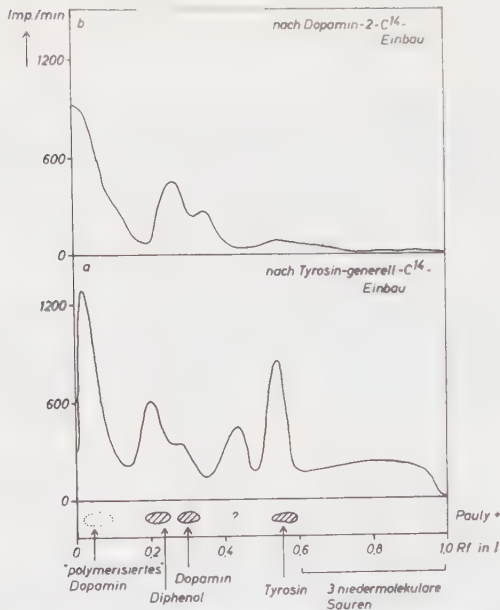


Abb. 19 Hydrolyseprodukte aus *Calliphora*-Cuticula nach Tyr-generell- C^{14} -Einbau (a) und Dopamin-2- C^{14} -Einbau (b). Chromatographische Auftrennung.

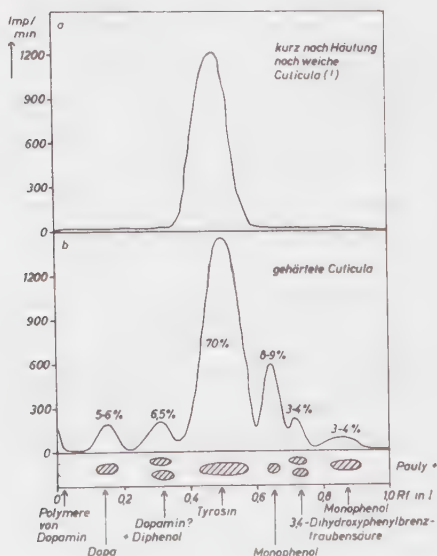


Abb. 20 Hydrolyseprodukte aus *Schistocerca*-Cuticula nach Tyr-generell- C^{14} -Einbau. a: noch weiche Cuticula (während der letzten Häutung); b: harte Imago-Cuticula. (Chromatogramme)

Cuticula und Exuvien verhielten sich in der Hydrolyse gleich und ergaben dieselben Produkte bei Schistocerca. Der Unterschied zwischen Exuvien und Cuticula ist nur ein quantitativer: Die Exuvien sind besonders hart und enthalten entsprechend mehr eingebaute aktive Tyrosinmetaboliten.

Dopa im Hydrolysat könnte man sich entstanden denken in der Proteinkette aus Tyrosin durch eine Phenoloxydase.

Tab. VI Eigenschaften der C^{14} -aktiven Hydrolyseprodukte aus Cuticeln nach Tyrosin-generell- C^{14} -Einbau

Rf-Wert	Ladung b. Elektr. Max. phorese pH 6,8	UV- Max. (mp)	Färbungen	Sonstige ⁺⁾	Struktur
0,00				nicht hydro- lysierbar	polymerisiertes Dopamin
0,15	Ø	278	$AgNO_3$ +; $Fe(CN)_3$ +	Rf-Werte	Dopa
0,18	stark -		Pauly neg.	flüchtig	niedermol. Säure
0,3	+	207; 229; 279; 310	Pauly +; $AgNO_3$ +	Rf-Werte	Dopamin ?
0,3	Ø	205; 281	Pauly: gelborang.	Rf-Werte	Diphenol
0,5	Ø	265 ?	Ninhydrin + u. a.	Elektroph. b. pH 4 u. pH 8,5	Tyrosin
0,60	Ø	279	Folin +; $AgNO_3$ neg.		?
0,70	-	280	Dinitrophenyl- hydrazin +	Rf-Werte	3,4 Dihydroxy- phenylbrenztrau- bensäure
0,70	+		Folin +; $AgNO_3$ neg.		Tyramin ?
0,8-0,9	Ø	255	Pauly +; $AgNO_3$ neg.		Monophenol

+) Siehe auch Methodischen Teil

Besprechung

Der Unterschied in den Hydrolysebruchstücken zwischen Calliphora und Schistocerca ist groß. Im Vordergrund stehen bei Schistocerca intakte Aromaten, bei Calliphora Bruchstücke. Damit ist auch ein Unterschied im gehärteten Produkt sicher, ein Unterschied im Weg, der zu dieser Härtung führt, ein Unterschied im Mechanismus der Sklerotisierung. Bei beiden Prozessen kommt N-Acetyl-dopamin eine gewisse Rolle zu, die bei Schistocerca nicht ausschließlich zu sein scheint.

Die Sklerotisierung der Insekten-Cuticula kann in Parallele gesetzt werden zur Gerbung tierischer Haut. In letzter Zeit wurde bei der Ledergerbung beobachtet, daß durch Phenole, die bestimmt keine Chinone ergeben, etwa Resorcin, Haut gehärtet werden kann, und zwar besonders gut (33). Die Proteine werden wahrscheinlich durch Wasserstoffbrücken vernetzt. Einen ähnlichen Vorgang möchte ich für die Schistocercacuticula vorschlagen, vielleicht in Kombination mit einer Chinongerbung. Deshalb sind vielleicht die Phenole mit zusätzlichen Koordinationspunkten vorhanden: Dihydroxyphenylbrenztraubensäure, "0,8-0,9"-Substanz, das Dopamin mit noch hypothetischer Carbonylfunktion.

Bei Calliphora wäre eine ausschließliche Chinongerbung wahrscheinlich. Die Chinone könnten bei der Hydrolyse zerstört werden: Teilweise werden sie frei und polymerisieren (Anfangsaktivitätsspitze), teilweise werden sie aufgespalten, etwa nach folgender Vorstellung:



Abb. 21 Hypothetische Spaltung von Chinonen in der Cuticula durch Hydrolyse

Für eine verschiedene Härtung spricht ferner die Ausfärbung der Cuticula; die Calliphoracuticula ist braun-schwarz, die sklerotisierten Heuschreckencuticeln jedoch hellgelb. Die schwarze Zeichnung geht auf Melanin zurück, sie läßt sich mit der Epidermis abschaben.

Der unterschiedliche Tyrosingehalt im Hydrolysat von Calliphora und Schistocerca ist einfach zu deuten durch die Zeit der Proteinbildung. Bei Calliphora ist die Proteincuticula, die Procuticula, schon fertig, wenn Tyrosin injiziert wurde, etwa 12 Std. vor der Verpuppung. Nur geringfügig wird Tyrosin noch eingebaut. Bei Schistocerca dagegen wird die neue Cuticula gerade vor der Häutung gebildet (siehe auch Einbau von Tyrosin in die Cuticula, S. 28).

Der Proteinanteil der Cuticula

Schließlich wurde noch das Substrat der Sklerotisierung, das Protein der Cuticula, analysiert. Genaue Analysen von Insektencuticula mit moderner Methodik liegen noch nicht vor. Die Daten der Amino-Säure-Analysen sind in Tabelle VII zusammengefaßt.

Es wurden Exuvien, das sind abgeworfene Cuticeln, hydrolysiert. Dabei blieb ein Rückstand, der nochmals hydrolysiert wurde. Im 2. Hydrolysat ist der Anteil an Serin und Threonin (OH-Gruppen) relativ höher, ebenso Prolin, Glutaminsäure und Amidstickstoff. Die Bindungen mit Glycin, Lysin und Alanin scheinen schon durch die erste Hydrolyse gelöst worden zu sein. Es ist möglich, daß durch die 2. Hydrolyse besonders Peptide angegriffen werden, die gebunden sind an die Härtungsphenole; diese werden, wie oben berichtet, durch 2. Hydrolyse vermehrt frei.

Im Vergleich zu anderen Strukturproteinen, z.B. Prokollagen, sei der höhere Tyrosingehalt hervorgehoben. Da es sich bei den Analysen um ungereinigtes Gesamt-Protein von Cuticeln handelte, können keine weiteren Vergleiche gezogen werden.

Tabelle VII. Werte der Aminosäureanalysen verschiedener Cuticeln von Schistocerca

Von jedem Hydrolysat wurden 4 Analysen gemacht und der Mittelwert gebildet; angegeben in Mol %!

	Wilde Schistocerca-Exuvien		Hydrolysat des Rückstandes		Wilde Schistoc. Bein-cuticeln	Albino-Exuvien	Prokollagen nach GRAHMANN (32)
	I	II	I	II			
Asp	3,28	2,57	1,28	1,85	5,94	2,77	4,76
Glu	3,84	2,74	12,3	1,87	7,50	3,18	7,58
Gly	11,92	6,95	4,06	5,78	8,23	8,27	32,73
Ala	19,67	12,22	2,17	9,49	16,58	14,77	10,78
Ser	5,11	3,81	19,5	2,83	5,71	3,33	2,92
Thre	2,59	2,00	13,1	1,75	3,68	1,95	1,88
Tyr	6,09	4,67	2,52	12,39	6,05	6,95	0,39
Val	1,87	1,63	1,11	4,0	(1,3)	1,61	2,26
Ileu	6,01	1,34	1,43	2,26	1,79	1,80	1,22
Leu	7,17	2,06	1,84	14,77	5,38	2,68	2,66
Phe	1,00	1,16	1,96	3,20	1,94	5,84	1,47
Pro	9,09	6,00	20,1	2,70	6,01	6,18	13,8
Hydroxypro.							8,23
His	2,31	2,07	1,73	1,60	7,39	3,64	0,65
Lys	6,79	0,80	3,61	1,09	4,68	15,33	2,88
Arg	1,99	1,50	1,35	1,17	4,92	3,71	5,45
Hydroxy- lysin							0,51
Meth.					-	-	0,45
NH ₃	8,38	4,97	12,10	10,37	9,23	17,99	-
Glucosamin	i.d. Rchg. nicht einbezogen	43,76!	-	22,39	4,97	nicht gemessen	-
Summe	99,99	100,25	99,66	102,71	100,00	100,00	100,00

C. Ein Vergleich zwischen der Wildform von Schistocerca und einer Albinomutante

An Hand der obigen Ergebnisse kann noch auf eine andere Frage eingegangen werden. Für die Versuche bei Schistocerca wurden mehrmals auch Tiere der Albinomutante der Wüstenheuschrecke gewählt. Diese wurde von HUNTER-JONES (36) zuerst beschrieben und unterscheidet sich durch das Fehlen der tief-schwarzen Zeichnung.

Alle Versuche, den bei dieser Genmutation vorliegenden biochemischen Block festzulegen, sind bisher gescheitert. KARLSON und SCHLOSSBERGER-RAECKE (45) beobachteten einen geringeren Einbau von Tyrosin-gen. C^{14} in die Cuticula der Albinomutante. Jedoch läßt die Mutante auch sonst alle Zeichen einer langsameren Entwicklung erkennen; die Stadien dauern länger, die Larven sind schwächlicher und anfälliger gegen Umwelteinflüsse.

Bei den oben berichteten Untersuchungen über den Tyrosinstoffwechsel ließen sich keine qualitativen Unterschiede zwischen Schistocerca der Wildform und der Albinomutante feststellen. Bei radioautographischen Untersuchungen von präparierten Cuticula-Stückchen nach Tyrosin- C^{14} -Einbau konnte keine Differenz zwischen wilden und Albino-Heuschrecken festgestellt werden.

MALEK unterscheidet nach histochemischen Versuchen einen Weg, der zum Sklerotin, der Hartsubstanz, führt, und einen, der "Melanin" hervorbringt und damit für die Ausfärbung verantwortlich ist (62).

Wie schon von SCHLOSSBERGER diskutiert, kann der Block bei der Albinomutanten auch lokal in den Zellen der Epidermis liegen, die für die "Melanin"-Ausbildung verantwortlich sind. Bei dieser Annahme muß es auch hier bleiben. Dieser "Melanin"-

Stoffwechsel-Unterschied liegt entweder unter der Nachweisempfindlichkeit der Methode oder beruht auf einem anderen Mechanismus.

Könnte diese Ausfärbung im Tryptophanstoffwechsel gebildet werden?

Nach der Injektion von Tryptophan-2-C¹⁴ in wilde und Albinoheuschrecken verschwand Tryptophan schnell aus dem Inneren und fand sich im Kot zum Teil unverändert, zum Teil decarboxyliert. In die Cuticula ist nur geringfügiger Einbau festzustellen (oben!). Dieser ist relativ größer als der Einbau von p-Hydroxyphenylpropionsäure, dürfte aber dem Proteinbedarf an Tryptophan entsprechen.

Wurde Tryptophan als Substrat einer Gesamtzympräparation aus Schistocerca geboten, blieb die Umwandlung unter 1 %. Wahrscheinlich wird etwas 5-Hydroxytryptophan gebildet.

Teil II: N-Acetyl-dopamin bei höheren Organismen

In der Einleitung ist eine Reihe natürlicher N-Acetyl-Verbindungen zusammengestellt. Berichte über N-Acetylierungen bei Säugetieren stammen erst aus den letzten Jahren. Ein Enzym aus Rattenleber vermag mehrere Amine zu acetylieren (89). Es ist wahrscheinlich, daß auch Dopamin im Säugetierorganismus acetyliert wird und acetyliert vorkommt.

Dem Versuchsprogramm liegt die Überlegung zugrunde, daß N-Acetyl-dopamin am ehesten dort zu finden sein müßte, wo Dopamin in größerer Konzentration auftritt. Die Konzentration kann durch Hemmung des abbauenden Enzyms erhöht werden.

Es sei vorweggenommen, daß die Verbindung schließlich im Harn eines Patienten mit Phäochromocytom aufgefunden wurde.

1) Zunächst sollen hier die erfolglosen Bemühungen erwähnt werden, im normalen menschlichen Urin N-Acetyl-dopamin nachzuweisen (siehe S.106). Ebenso verliefen die

2) Versuche mit Rinder-Nebennieren.

Dopamin tritt im Säugetierorganismus in der Hauptsache als Vorstufe der Hormone Adrenalin und Noradrenalin auf. In mehreren Versuchen wurden Extrakte aus Nebennieren untersucht, insbesondere aus Nebennierenmark, das bekanntlich viel Brenzkatechinamin enthält. Auch durch Variation der Extraktionsmittel gelang es nicht, acetylierte Amine zu isolieren (über das Vorkommen eines Aldehyds siehe Versuchsbeschreibung S. 107!).

3) Hemmung der Monoaminoxidase

Die Monoaminoxidase ist eines der destruktiven Enzyme, die für den Hormonabbau sorgen. Die Monoaminoxidase kommt in

fast allen Geweben, besonders in Muskeln und Nerven, vor. Wird die Monoaminoxydase gehemmt, werden die Amine angehäuft (103).

Die Monoaminoxydasen benötigen Pyridoxalphosphat als Coferment. Deshalb sind sie durch Hydrazine, die mit Aldehyden koppeln, hemmbar; der wirksamste Hemmstoff, auch in vivo, ist Iproniazid (1-Isonicotinyl-2-isopropyl-hydrazin) (102).

Mit der Anhäufung der Amine wächst die Chance, ihre Umwandlungsprodukte zu fassen. Läßt sich auf diese Weise das Acetyl-derivat isolieren?

a) Im ersten Versuch (Exptl. Teil S.108) erhielt eine Reihe von Mäusen Injektionen von Iproniazid; der Urin wurde gesammelt über 12 Std., die getöteten Tiere wurden seziiert. Es gelang weder im Urin, noch in den Organen, Acetylamine zu finden ⁺⁾ .

b) Ein potenter Monoaminoxydase-Inhibitor ist auch das Tuberkulostatikum Isonicotinsäurehydrazin (INH). Die dadurch angehäuften Amine verursachen auch klinische Symptome.

Es war jedoch nicht möglich, acetylierte Umwandlungsprodukte im Harn von Tbc-Patienten unter INH-Behandlung nachzuweisen.

4) Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin und anderer neuer Dopamin-Metaboliten im menschlichen Harn beim malignen Phäochromoblastom

Das Phäochromocystom, Geschwulst chromaffiner Gewebe im Bereich des sympathischen Nervensystems, bietet eine weitere

⁺⁾ Noch vor Abschluß dieser Versuche gelang es GOLDSTEIN und Mitarbeitern, im Urin iproniazidgehemmter Ratten N-Acetyl-dopamin nachzuweisen (30).

Möglichkeit, gemäß obiger Überlegung, einen erhöhten Brenzkatechinaminstoffwechsel zu beobachten.

Das Phäochromocytom stellt keine seltene Erkrankung dar, wie vielfach angenommen wurde. Bis 1950 waren insgesamt nur etwa 200 Fälle publiziert worden (97). Mit den neuen diagnostischen Möglichkeiten wuchs jedoch die Zahl der Berichte. Von diesen Fällen waren weniger als 10 % - die einzelnen Statistiken scheitern noch an der geringen Zahl - maligne Entartungen (69).

Biochemisch ist das gutartige Phäochromocytom durch hohe Adrenalin- und Noradrenalin-Ausschüttung gekennzeichnet. Die klinischen Symptome erklären sich aus deren Wirkung. In Zellgranula gespeichert, werden die Hormone nur stoßweise frei (100). Zum typischen klinischen Bild gehören deshalb die Pal'schen Blutdruckkrisen, verbunden mit pulsierendem Kopfschmerz. Aber auch Dauerhypertonie wird beobachtet, mit erhöhtem Blutzucker und Grundumsatz, Tremor und Blässe (99) +).

Über die bösartige Form liegen nur wenige Berichte vor. Dem Kliniker erscheint sie häufig als Krebsleiden unklarer Lokalisation, was schon dafür spricht, daß die endokrine Aktivität verloren gehen kann (siehe auch 40; 74). McMILLAN (67) fand im Gewebe mehr Dopamin als Adrenalin bzw. Noradrenalin und nahm an, daß die Umwandlung Dopamin zu Noradrenalin unvollständig ist. A. STURM jr. (93) berichtete kürzlich über die vermehrte Ausscheidung von Vanillinsäure.

Die Diagnostik des Phäochromocytoms bedient sich auch röntgenologischer Methoden.

Beweisend ist jedoch beim gutartigen Phäochromocytom nur

+) Über Fragen der Diagnostik und Klinik ist kürzlich von SACK zusammenfassend berichtet worden (79).

der Nachweis der Brenzkatechinamine oder ihrer Abbauprodukte im Harn (82).

Nach den bisherigen Kenntnissen über den Stoffwechsel der Brenzkatechinamine (18) wird ein geringer Teil unverändert, ein Teil an Glucuronsäure gebunden oder methyliert ausgeschieden (52; 65). Der Hauptumwandlungsweg ist der Seitenkettenabbau, der über 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (2) bis zur Vanillinsäure führt (22). Die Methylierung ist nicht obligatorisch, auch die freien Diphenolcarbonsäuren wurden nachgewiesen.

Der Patient

Patient L.P., 41 Jahre alt. Der Vater starb an Magenkrebs. Aus der Kindheit wurden Röteln angegeben. Im Krieg erlitt er Granatsplitterverletzungen am linken Arm, der linken Schulter, an Brust und Kopf. Seit 10 Jahren klagte der Patient immer wieder über Magenbeschwerden. Vor zwei Jahren wurde röntgenologisch ein Ulcus ventriculi festgestellt, das auf konservative Behandlung verschwand. In der Folge traten aber wieder dieselben Beschwerden auf, besonders Sodbrennen nach der Mahlzeit und fauliges Aufstoßen. Der Patient glaubte auch, die Entleerung des Magens "glucksend" verspüren zu können. Mit heftigen Schmerzen im Epigastrium wurde er in die Klinik eingewiesen.

Der Allgemeinzustand war bei der Aufnahme gut. Die Herzgrenzen waren normal, die Herztöne kräftig mit einem leisen undeutlichen Systolikum über der Herzspitze. Blutdruck konstant um 130/85, 120/85. Der Puls war regelmäßig, 76/Min. Das Abdomen war weich, Leber und Milz nicht tastbar. Beiderseits war er Bruchbandträger, es bestanden reponible Leistenhernien. Druckschmerzhaftigkeit wurde angegeben über dem mittleren Epigastrium. Sonst ohne Befund. Röntgenologisch wurde nach Füllungs- und Kompressionsaufnahmen ein Magenkarzinom an der kleinen Kurvatur vermutet. Der Pylorus war eingeengt, die Duodenal-

schleife schien auseinander gedrängt. Die Kreislauffunktionsprüfung brachte normale Werte. Im Volhard-Versuch wurde maximal verdünnt zu spez. Gewicht von 1002, maximal konzentriert zu 1026, die 4-Stunden-Menge betrug 880 ccm, die 24-Stundenmenge 1500 ccm. Bei der Laparotomie wurde eine gut kindskopfgroße Tumorausammlung im Bereich des Pankreas retroperitoneal entdeckt. Die Infiltrationen reichten entlang der Aorta nach oben und unten, eine Mobilisation war nicht möglich. An der kleinen Kurvatur fand sich ein kleiner beweglicher Tumor. Es wurde eine Probeexzision gemacht. Der Patient erholte sich vom Operationstrauma schnell. Die alten Beschwerden verstärkten sich jedoch in den nächsten Tagen. Zusätzlich traten heftige Schmerzen im Bereich der Brustwirbelsäule auf. Auf weitere Untersuchungen wurde verzichtet. Wegen der sich steigenden Schmerzen mußte der Patient unter Dauermorphiumwirkung gesetzt werden, was zu Hause fortgesetzt wurde. Der Patient starb vier Wochen nach der Diagnose.

Der Patient hatte keine abnormen Pigmentierungen.

Es ist bemerkenswert, daß niemals erhöhter Blutdruck festgestellt worden war. Auch durch Betasten des Tumors während der Operation wurde keine Erhöhung ausgelöst. Ein Histamin-test konnte nicht mehr durchgeführt werden.

Pathologie

Histologisch wurde die Diagnose "bösartiges Phäochromocytom" gestellt ⁺⁾ . Das Exzisionsstück war völlig durchsetzt mit atypischen Epithelformen, angeordnet in Nestern und Strängen.

Aufgefallen sind die vielen Mitosen, die das schnelle Wachstum des Tumors voraussagten (Abb. 24).

+) Der histologische Bericht stammt von Herrn Prof. Schairer, Pathologisches Institut, Ulm; der Chefarzt des Kreiskrankenhauses Heidenheim (Brenz), Dr. Banz, überließ mir freundlicherweise das Krankenblatt.

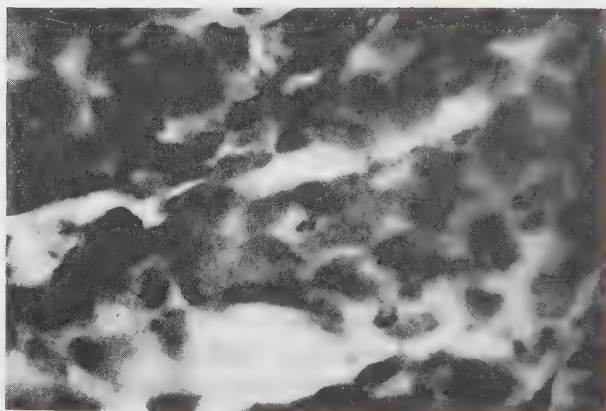


Abb. 22 Hämatoxylin-Eosinpräparat des Tumorgewebes;
Vergr. 320-fach

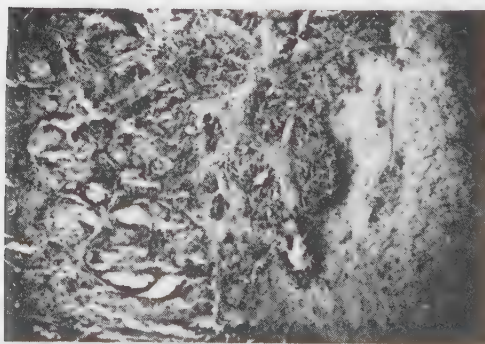


Abb. 23 Hämatoxylin-Eosinpräparat des Tumorgewebes;
Vergr. 75-fach

Das Protoplasma der Tumorzellen war mit Hämatoxylin stark anfärbbar, bis zu rotblauer Farbe. Die Zellen hatten runde bis ovale Kerne mit großen Kernkörperchen. Der Tumor war nach außen von einer bindegewebigen Kapsel begrenzt.

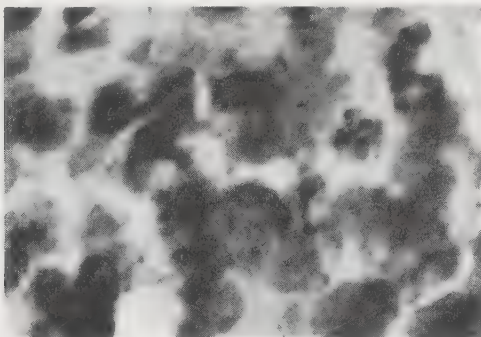


Abb. 24 HE-Präparat des Tumors; Vergr. 1200-fach

Biochemische Befunde

Der Urin des Patienten wurde während der letzten drei Lebenswochen gesammelt.

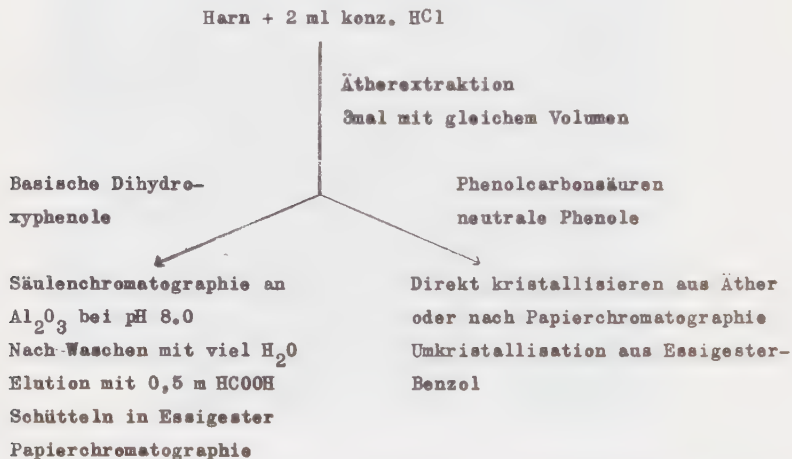
Der Patient bekam um diese Zeit nur wenig Nahrung, leichte Normalkost, keine Genußmittel. Er erhielt Pharmaka aus der Morphinreihe, Pyrazolonderivate, Cyclohexanderivate. Bei den letzteren ist gelegentlich eine Aromatisierung im Körper beobachtet worden (101), was hier eventuell in Betracht kommen könnte.

Die Katecholaminbestimmung ergab 32 μ g Adrenalin und 208 μ g Noradrenalin im 24-Std.-Harn (800 ml).

Der Harn des Patienten wurde zur Isolierung der phenolischen Stoffwechselprodukte aufgearbeitet, wie im Versuchsteil aus-

führlich beschrieben. Das Schema gibt den Weg kurz an:

Allgemeines Schema zur Isolierung von Phenolen aus Harn,
im besonderen zur Isolierung von Acetylaminen:



Ätherlösliche Metaboliten:

Das aus dem Äther erhaltene kristalline Gemisch mußte noch über eine Papierchromatographie in System VI (Macherey-Nagel-2214FF-Papier) aufgetrennt werden. Es sei vermerkt, daß keine freien Diphenolcarbonsäuren (wie Dihydroxymandelsäure u.a.) in der Ätherphase nachweisbar waren.

Zwei Substanzen (Rf-Werte 0,1 und 0,3) wurden aus dem Papier eluiert und kristallin erhalten. Die Substanz mit dem Rf-Wert 0,1 wurde in einer Ausbeute von 6 bis 7 mg/4l Harn erhalten und zeigte ein Uv-Absorptionsmaximum bei 282,5 mμ, das im Alkalischen nach 262 mμ verschoben wurde. Schmelzpunkt = 133 - 134°C.

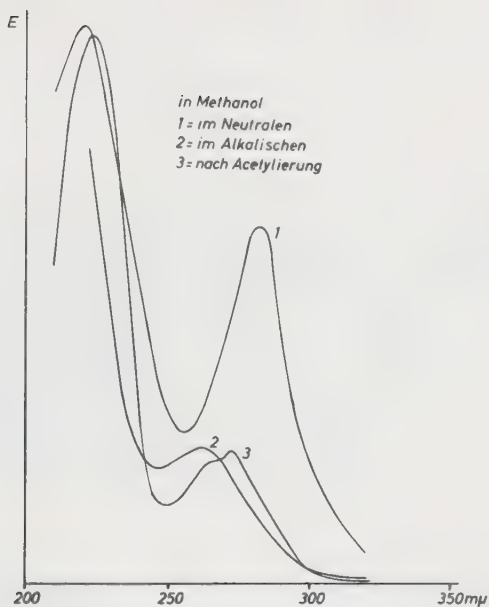


Abb. 25 UV-Spektrum der Substanz "O,1" in Methanol. Verschiebung im Alkalischen und durch Acetylierung

Aus dem Infrarot-Spektrum (Abb. 26) konnte auf eine 1,2,4-substituierte aromatische Verbindung mit mindestens 2 OH-Gruppen geschlossen werden. Dieselbe Information konnte aus dem kernmagnetischen Resonanzspektrum entnommen werden. Die Substanz erwies sich als neutral in der Elektrophorese bei pH 6,8. Eine Reihe von Modellsubstanzen, darunter 1,2,4-Trihydroxybenzol und 3,4-Dihydroxyphenyl-äthylglykol zeigten keine übereinstimmenden Eigenschaften. Eine C-H-Analyse ⁺⁾ ergab folgende Werte:

C	60,1 %
H	6,65%
N	1,6 %

⁺⁾ Labor: Dr. W.Walisch; Institut für org.Chemie der Universität Saarbrücken.

Die Analyse wurde nach Messen des KMR-Spektrums in Pyridin gemacht. Rechnet man N zu Resten von Pyridin, bleibt als mögliche Formel der Verbindung 3,4-Dihydroxy-benzyl-alkohol.

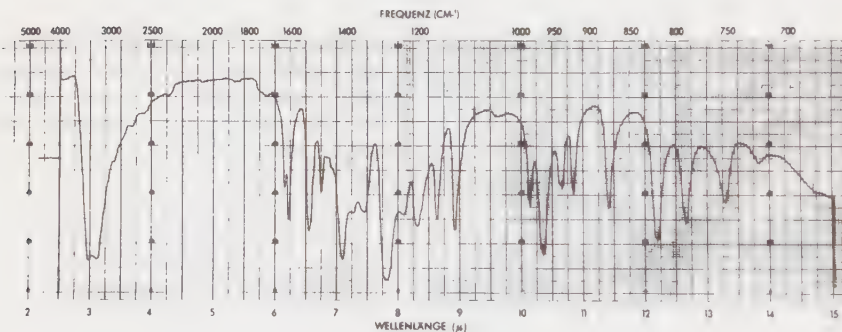


Abb. 26 Infrarot-Spektrum des unbekannten Diphenols, in KBr gepreßt. Die hohe Absorption bei 3 μ spricht für das Vorliegen mehrerer OH-Gruppierungen. Schwierigkeiten bereitet die Interpretierung des Komplexes zwischen 10 und 11 μ . Die Absorptionen im langwelligeren Bereich sind als -Schwingungen eines 1,2,4-substituierten Phenols zu betrachten.

Die Substanz mit dem Rf-Wert 0,3 zeigte auf dem Papier eine starke Färbung mit Silbernitrat und Dinitrophenylhydrazin. Die UV-Maxima lagen bei 312, 278 und 232,5 μ m (in Methanol). Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 153°C. Das Infrarot-Spektrum und die vorher erwähnten Eigenschaften stimmten genau mit denen von Protocatechualdehyd überein. Die Verbindung wurde damit als 3,4-Dihydroxybenzaldehyd identifiziert. Die Ausbeute aus 24-Stunden-Urin betrug 7 mg (Abb. 28 bis 30).

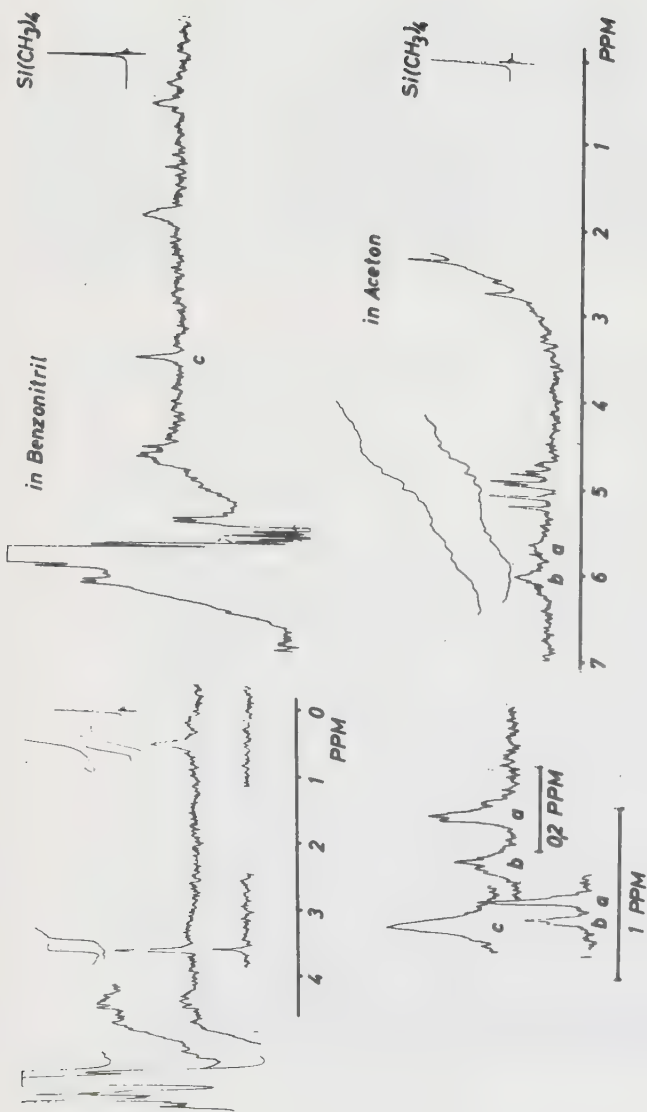


Abb. 27 NMR-Spektrum ⁺ des unbekannten Diphenols, in Aceton gemessen bzw. in Pyridin (obere Kurve).

⁺) Aufnahme: Dr. Fritz, Anorg. chem. Institut der Universität München.

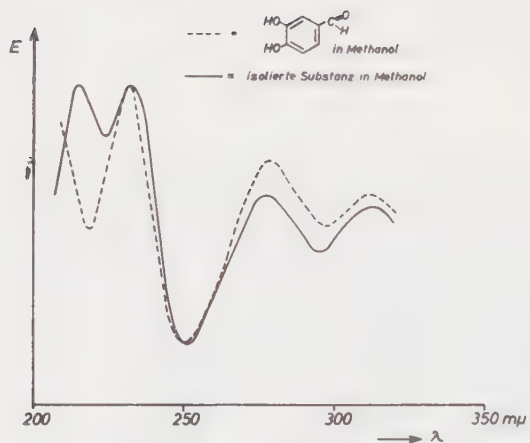


Abb. 28 UV-Spektrum der isolierten Substanz mit dem Rf-Wert 0,3

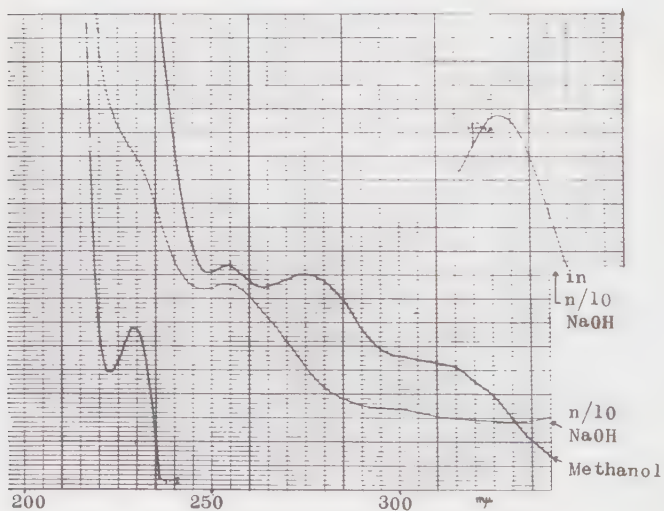


Abb. 29 Verschiebung der UV-Absorptionsmaxima im Alkalischen

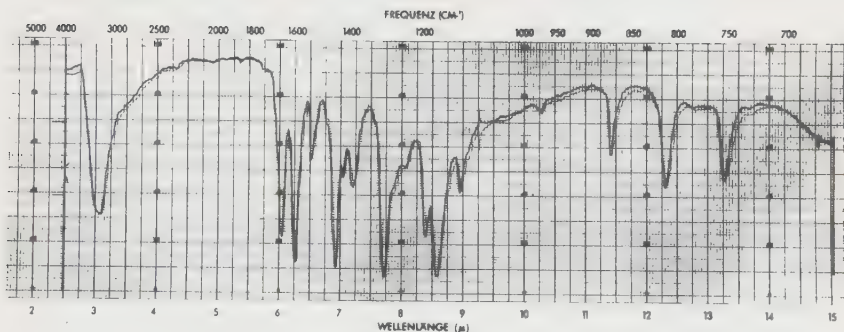


Abb. 30 Infrarot-Spektrum der isolierten Substanz im Vergleich mit dem von Protocatechualdehyd (in KBr).
(Schwarze Kurve = isolierte Substanz)

Wasserlösliche Metaboliten:

Nach der Trennung über einer Al_2O_3 -Säule (vgl. S.106!) wurde papierchromatographiert in System I. Dabei wurde ein Substanzgemisch von R_f 0,85 erhalten, das durch Rechromatographie in System IX in drei Komponenten aufgetrennt werden konnte.

Die erste Substanz hatte folgende Eigenschaften: Sie wandert nicht in der Elektrophorese bei pH 6,8, das UV-Absorptionsmaximum liegt bei 281 m μ . Sie gibt starke Reaktion mit Silbernitrat, färbt Pauly's Reagens (diazotierte Sulfanilsäure) orange-rot, reagiert mit Folins Phenolreagens und zeigt keine Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin. Saure Hydrolyse verändert die Eigenschaften der Substanz nicht. Die Substanz wurde in verschiedenen Systemen auf Whatman-4-Papier mit Vergleichssubstanzen rechromatographiert und lief in den verwendeten Systemen wie Dihydroxyphenyläthan. Die R_f -Werte waren:

in I	0,85	in X	0,95 - 1,0
II	0,95	XV	0,65 - 0,70
IX	0,85 - 0,9	XVI	0,75

Das wichtigste Ergebnis brachten die anderen beiden Komponenten; sie erwiesen sich als N - A c e t y l - d o p a - m i n und N - A c e t y l - n o r a d r e n a l i n . Die Identifizierung gelang durch Vergleich der Rf-Werte in den Systemen I, II, IX (siehe exptl. Teil!) mit synthetisiertem Material durch Farbreaktionen und die Hydrolyse. Diese ergab Dopamin bzw. Noradrenalin. Diese Tatsache beweist zusammen mit den anderen Eigenschaften, daß es sich um N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin gehandelt haben muß. Aus dem Hydrolysat ließ sich ein weiteres Hydrolyseprodukt abtrennen, höchstwahrscheinlich 3-O-Methylnoradrenalin.

Damit war die eingangs gestellte Frage in positivem Sinne beantwortet. Auch beim Menschen kommt - unter bestimmten Bedingungen - N-Acetyl-dopamin vor.

Besprechung der Ergebnisse

Durch diese Versuche sind 3 Metaboliten zum ersten Mal in menschlichem Harn nachgewiesen worden: Protocatechualdehyd, N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin. Wie können wir uns diese Produkte entstanden denken?

Protocatechualdehyd kann in das Abbauschema der Brenzkatechamine eingeordnet werden, und zwar als Vorstufe der 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Die Anhäufung eines Aldehyds als Endprodukt ist ungewöhnlich. Normalerweise sind Aldehyde im Stoffwechsel unbeständig und reagieren zur Säure oder zum Alkohol weiter. Ob die Ursache hierzu im anomalen Stoffwechsel der Tumorzellen liegt, kann nicht ohne weitere Experimente entschieden werden.

Die Acetylierung stellt einen neuen Stoffwechselweg der Brenzkatechinamine dar. Die Stickstoff-Acetylierung ist ein vom Organismus viel verwendeter Entgiftungsweg (siehe Einleitung!). Von N-Acetyl-tyramin und N-Acetyl-serotonin (14; 66) wissen wir, daß die Acetylierung die Wirksamkeit vermindert. Im Gegensatz dazu kennen wir nun N-Acetyl-dopamin und die Acetylierung bei den Insekten als aufbauenden Syntheseweg.

Welche Bedeutung kommt in diesem Fall der N-Acetylierung zu? Zur Klärung dieser Frage wurden die pharmakologischen Eigenschaften der Acetylderivate mit den freien Aminen verglichen.

5) Pharmakologische Versuche +)

Experimente mit isolierten Herzpapillarmuskeln und isolierten Samenblasen von Meerschweinchen zeigten, daß die inotrope Wirkung durch die Acetylierung um 2 Zehnerpotenzen abgeschwächt wird (Abb. 31).

Die inotrope Wirkung von N-Acetyl-dopamin bzw. noradrenalin kommt zustande durch eine Vergrößerung der Anstiegssteilheit; die Anstiegszeit bleibt etwa gleich. Die Gesamtkontraktionszeit wird geringfügig verkürzt (Abb. 33).

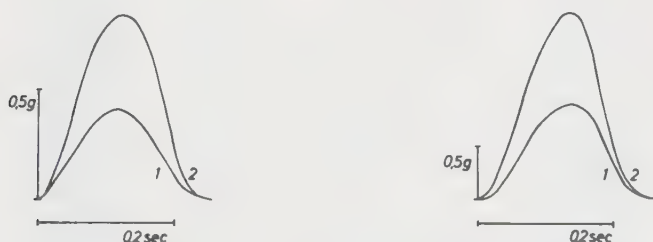


Abb. 33 Optische Registrierung des Kontraktionsablaufs am Herzmuskel

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| a) 1 = Leerkontraktion vor, | b) 1 = Leerkontraktion vor, |
| 2 = 4' nach Zugabe von | 2 = 2' nach Zugabe von |
| N-Acetyl-dopamin | N-Acetyl-noradrenalin |
| (1×10^{-3}) | (2×10^{-4}) |

+) Diese Versuche entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn H.G. Schöber im Labor von Prof. Reiter und Dr. Felix, Pharmakolog. Institut München



Abb. 31 Wirkung der Katecholamine auf die Herzmuskulatur bei verschiedenen Konzentrationen. Abszisse: Konzentration der getesteten Substanz in Mol/l. Ordinate: Leistungssteigerung in g gehobenen Gewichts. Die wirksamen Konzentrationen der acetylierten Amine sind unphysiologisch hoch.

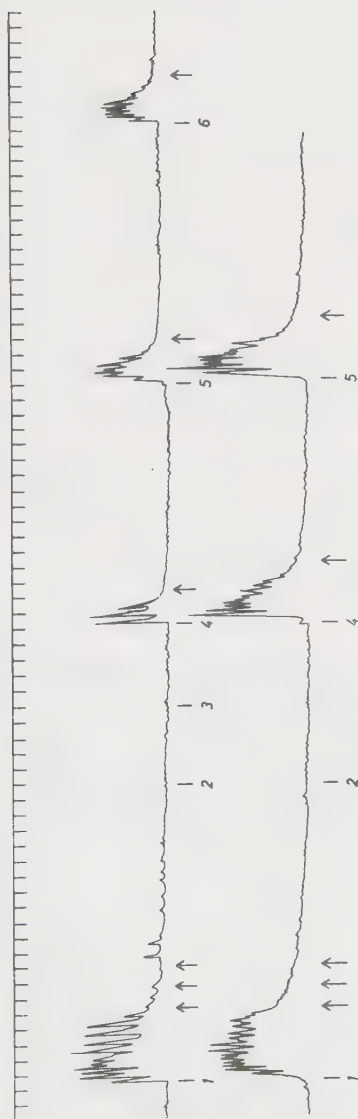


Abb. 32 Einfluß von N-Acetyl-dopamin auf die Samenblasermuskulatur (Meerschweinchen) und auf die Wirkung von Adrenalin: 1 : 10^{-7} M Adrenalin, Auswaschen; 2: $5,6 \times 10^{-3}$ M N-Acetyl-dopamin; 3: nochmals Gabe von N-Acetyl-dopamin bis Konz. von 10^{-2} M; 4,5,6: Adrenalin, 10^{-7} M. Zeitangabe in Min.

Die Wirkung von N-Acetyl-dopamin in den hohen Dosen hält länger an als die Wirkung von Adrenalin oder Dopamin. Die Dauer der N-Acetyl-noradrenalin-Wirkung scheint mehr der Adrenalinwirkung zu entsprechen (Abb. 34 und 35).

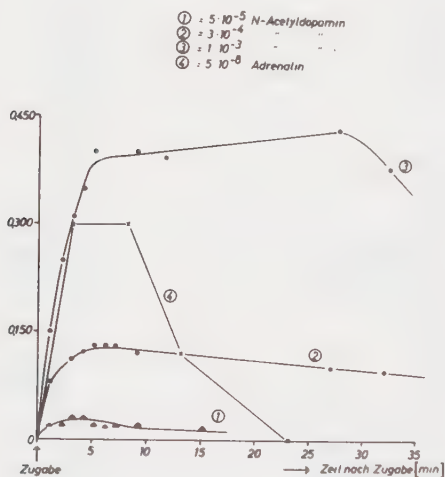


Abb. 34 Die Wirkungsdauer von N-Acetyl-dopamin am Herzmuskel

Die Adrenalinwirkungsdauer ist bei gleichzeitiger Anwesenheit von N-Acetyl-dopamin gehemmt und stark verkürzt (Abb. 36 und 32).

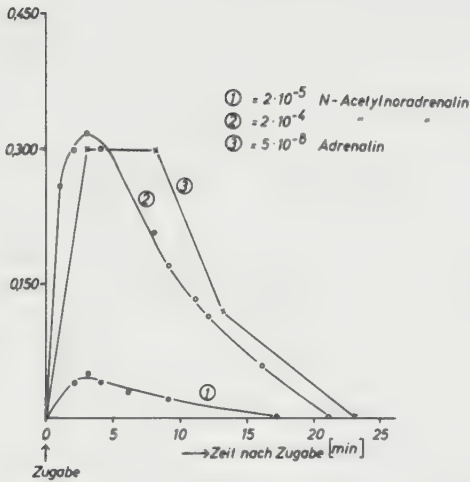


Abb. 35 Die Wirkungsdauer von N-Acetyl-noradrenalin am Herzmuskel

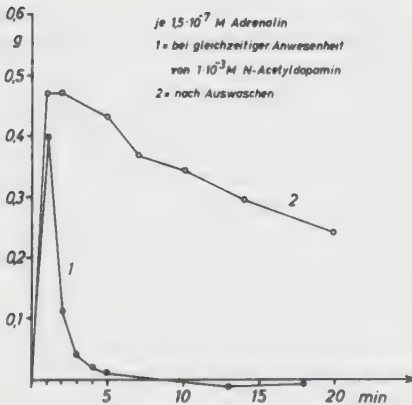


Abb. 36 Einfluß anwesenden N-Acetyl-dopamins auf die Adrenalinwirkung an Herzkapillarmuskeln
 Abszisse: Zeit; Ordinate: Leistungssteigerung in g gehobenen Gewichts

Besprechung

Wie könnte man die lang anhaltende Wirkung von N-Acetyl-dopamin in hohen Dosen und die Hemmung der Adrenalinwirkung durch anwesendes N-Acetyl-dopamin zu verstehen suchen?

N-Acetyl-dopamin könnte wegen seiner Strukturähnlichkeit mit Adrenalin eine gewisse Affinität zu den Rezeptoren besitzen, an denen auch Adrenalin angreift. Steigert man die Konzentration, werden genügend Rezeptoren besetzt, um eine Wirkung zustande kommen zu lassen. Die leichte Hemmung der Adrenalinwirkung könnte durch eine Blockierung der Rezeptoren verursacht sein. Für andere Substanzen ist das bekannt, wenn auch in anderen Konzentrationen, wie z.B. für Dichloroisopropyl-noradrenalin.

Da das Amin acetyliert ist, kann die Aminoxydase nicht angreifen. Die Substanz wird nicht abgebaut, die Wirkung hält länger an.

Eine Verkürzung der Adrenalinwirkung bei gleichzeitiger Anwesenheit von N-Acetyl-dopamin könnte nur durch einen beschleunigten Adrenalinabbau zustande kommen (ähnliche Beobachtungen bei 4).

N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin haben nur schwache inotrope Wirkung am Herzmuskel.

Durch diese Experimente konnte die Hypothese gestützt werden, daß die N-Acetylierung auch der Hormone Dopamin und Noradrenalin ein Inaktivierungsweg ist. Klinisch war bei diesem Patienten ja auffällig, daß er trotz seines großen Tumors keine Blutdruckkrisen oder Dauerhypertonie hatte. Wahrscheinlich bestanden auch keine unauffälligen Kurzkrisen (78).

Eine Erklärung hierfür läßt sich aus den biochemischen Befunden geben. Erstens kann durch die Acetylierung eine rasche Inaktivierung der ausgeschütteten Hormone erfolgt sein. Zwei-

tens ist nach den pharmakologischen Versuchen an die Möglichkeit zu denken, daß das vorhandene Adrenalin in seiner Wirksamkeit blockiert wurde. Zur Erhaltung des normalen Blutdrucks konnte drittens auch eine Hemmung der Biosynthese beigetragen haben. Denn N-Acetyl-dopamin ist auch ein starker Hemmstoff der Dopa-Decarboxylase (siehe Einleitung). Versuche, eine blutdrucksenkende Wirkung der acetylierten Brenzkatechinamine zu prüfen, sind angeregt worden.

Der Nachweis des N-Acetyl-dopamins beim Phäochromoblastom wirft die Frage auf: ist dieses Produkt nicht physiologisch, also auch beim Gesunden, zu finden, und wie verhalten sich gutartige Phäochromocyto~~m~~e?

Für den "normalen Metaboliten" N-Acetyl-dopamin sprechen: Die Enzyme, Aminacetylasen, haben geringe Spezifität. Amine verschiedenster Stoffklassen werden acetyliert und erfüllen verschiedene Aufgaben.

Über die Versuche mit Normalurin ist oben berichtet worden. Vielleicht ist eine empfindlichere Methode nötig, beim Gesunden N-Acetyl-brenzkatechinamine zu finden.

Bei 6 untersuchten Fällen von gutartigem Phäochromocytom ist es nicht gelungen, N-Acetyl-dopamin nachzuweisen (siehe exptl. Teil). Es bleibt zu untersuchen, ob das N-Acetyl-dopamin für bösartige Formen des Phäochromocytoms charakteristisch ist oder ob es auch beim gutartigen Phäochromocytom - vor allem mit normalem Blutdruck - vorkommen kann.

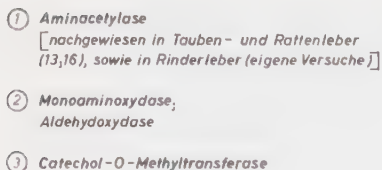


Abb. 37 Teilschema des Katecholaminstoffwechsels

Teil III: Über das Vorkommen der Amin-Transacetylase bei Insekten und Säugetieren

Im vorausgehenden Bericht ist das Vorkommen einiger Acetylamine beschrieben. Ein Enzym, verantwortlich für diese Synthesen, das also die Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf das Amin überträgt, ist in Rattenleber gefunden worden (98) und kürzlich auch bei *Calliphora erythrocephala* untersucht worden (42).

Mit der empfindlichen radiochromatographischen Methode wurde versucht, in den in dieser Arbeit genannten Geweben oder Organismen *in vitro* ebenfalls eine solche Enzymaktivität nachzuweisen. Diese Methode ist auf S. 119 beschrieben. Die Aktivität solcher Präparate, ausgedrückt in % Umwandlung des Substrats, ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle VIII. Aktivität der Amin-Transacetylasen in verschiedenen tierischen Geweben

Nr. des Versuchs	Enzympräparat ⁺⁾ aus	Acetylase- aktivität = % Umwandl. zu N-Acetyl- tyramin	Umwandlg. produkt nicht identifi- ziert ⁺⁺⁺⁾	Aminoxy- dase % Umwandl. zu p-Hydroxy- phenylessig- säure ⁺⁺⁾	Bemer- kungen
1	Kontrolle Calliphoralarven (7-Tage-alt)	 50,0	5,0	 0	 in Phos- phatpuf- fer

+) Substrat: Tyramin

++) Die Methode der Papierchromatographie erlaubte, gleichzeitig, wenn auch nicht optimal, die Aminoxydaseaktivität zu bestimmen.

+++) keine elektrophoretische Entscheidung möglich gewesen.

2	Kontrolle		5,5		in
	Leber (Rind)	9			Puffer
	Calliphoralarven	92,7		0	
3	Kontrolle	5		0	
	Leber (Rind)	22		0	
	Gesamt				} 0,25 % in Sucrose
	Kerne	8-9		1-2	
	Mitochondrien	13		0	
	Überstand	8,5		20	
	Schistocerca (Imago)	9,2		0	sonst in Puffer
	Phäochromocytom Operationspräp.		3,5		
4	Kontrolle	0		0	
	Herzmuskel (Kalb)	0		0	
	Skelettmuskel (Kalb)	0		0	
	Stammganglien (Schwein)	0		0	in
	Leber (Schwein)	0		35	0,25 % Sucrose
	Nebennieren (Rind)				
	Kerne	4,5		11,5	
	Mitochondrien		12		
	Überstand	etwa 3		etwa 3	
	Niere (Schwein)		4		
	Tenebrio molitor	7,5		0	
5	Kontrolle	unter 1		0	
	Calliphoralarven	10		0	
	Calliphorapuppen	16		0	
	Drosophilafliegen	9		0	
	Drosophila Puppen + Larven	9		0	in
	Schistocerca häutend	2,5		0	Puffer
	Nebennieren (Rind)		2		
	Leber (Rind)		5		
	Phäochromocym Op. präp.		1,5		

6	Kontrolle		5,4	
	Calliphoralarven	26,3		0
	Leber (Rind)		4,8	in
	Putamen (Rind)	0		0 Puffer
	Nucleus niger (Rind)		unter 1	
	Cerebellum (Rind)		unter 1	

Zum Vergleich der Werte siehe die Angaben über Enzymkonzentrationen im Methodischen Teil, Seite 120.

Es ist ersichtlich, daß nicht nur Calliphora-Larven, sondern auch Puppen Acetylase-Aktivität besitzen. Dies kann als Beweis gelten, daß die Regulation der Verpuppung und Sklerotisierung hauptsächlich an der Dopa-Decarboxylase angreift (Teil I und 47), die Dopa-Decarboxylase also das regulierende Glied der Kette ist.

Bei den Insekten, bei denen auch in vivo der Nachweis von N-Acetyl-Dopamin gelang, ist auch ein acetylierendes System vorhanden. Dies wurde gezeigt für *Drosophila melanogaster*, *Schistocerca gregaria* Forskal und *Tenebrio Molitor*.

Die untersuchten Säugetiergewebe zeigten ein bekanntes Muster der Aminoxydaseaktivität. Aminacetylaseaktivität ist sicher vorhanden in Lebergewebe (Rind), die Fraktionierung brachte keinen sicheren Anhalt über die Lokalisation in der Zelle. Auch die Aktivität des Präparats aus Nebennieren lag deutlich über dem Blindwert. In Gehirn und Muskel war keine Acetylase-Aktivität feststellbar.

Gesamtdiskussion

N-Acetyl-dopamin wurde durch die oben beschriebenen Versuche als ein weit verbreiteter Metabolit erkannt.

Bei einer Reihe von Insekten werden die aromatischen Aminosäuren decarboxyliert und teilweise acetyliert. Dieser Stoffwechselweg steht in einer zeitlichen Beziehung zur Entwicklung. Dies haben die Aktivitätsmaxima der Decarboxylase deutlich gemacht, die bei *Schistocerca* vor und nach der larvalen Häutung liegen. Die Beziehung ist auch kausal: Einbauversuche und die Lokalisation der Acetylierung in der Epidermis sprechen sehr für eine Bedeutung dieser Verbindungen für die Härtung der Cuticula, die nach jeder Häutung oder bei der Verpuppung vor sich geht. Für alle Insekten scheint somit zu gelten, daß Diphenole, und zwar N-Acetyl-dopamin bei den hier untersuchten Insekten, die Cuticula härten. Die Hydrolyseversuche mit Cuticeln zeigen jedoch, daß verschiedene Mechanismen der Härtung vorliegen müssen.

Tyrosin wird nicht nur hydroxyliert und decarboxyliert; es wurde eine Reihe weiterer Substanzen nachgewiesen, die dem Tyrosinabbau zuzurechnen ist. Wie zu erwarten, wird Tyrosin von der Seitenkette her oxydativ eingebaut. Auf Seite sind die entstandenen Säuren in ein Stoffwechselschema eingeordnet. Letztes nachgewiesenes Abbauprodukt ist p-Hydroxybenzoesäure; Heuschrecken scheinen allerdings den aromatischen Ring auch aufbrechen zu können.

Beim Menschen wird ebenfalls Dopamin (auch Noradrenalin) acetyliert. Wie die pharmakologischen Versuche beweisen, dient die Acetylierung beim Menschen als Inaktivierungsweg. Dieser Weg läuft parallel dem oxydativen Hormonabbau, dem durch diese Experimente einige neue Abbauprodukte, besonders Protocatechualdehyd, angegliedert werden konnten. Es besteht

außerdem die Möglichkeit, daß N-Acetyl-dopamin rückkoppelnd die Biosynthese der Hormone Noradrenalin und Adrenalin hemmt, denn in vitro wirkt N-Acetyl-dopamin als Inhibitor der Dopa-Decarboxylase. Eine zusätzliche Hemmung der pharmakologischen Adrenalin-Wirkung wurde oben schon diskutiert (S. 57).

Die Arbeit stellt durch die Versuche mit Harn von Phäochromocytom-Kranken und die pharmakologischen Versuche einen unmittelbaren Zusammenhang zur Medizin her. Welche Ergebnisse sind für die Klinik verwertbar?

Ein kleiner Einblick in den bisher unbekannten Stoffwechsel beim malignen Phäochromoblastom ist gegeben worden. Ob die Diagnostik auf diese Befunde zurückgreifen können, kann noch nicht gesagt werden. Bei der Frage "Phäochromocytom oder nicht" muß jedenfalls daran gedacht werden, daß es völlig unauffällige Formen wie die beschriebene gibt. Es wäre interessant, auch Patienten mit Melanomen, Neuroblastoma und Parkinsonismus unter dem Aspekt der N-Acetylierung untersuchen zu können.

Vielleicht wird es möglich sein, mit N-Acetyl-dopamin gewisse Formen des erhöhten Blutdrucks (adrenalinbedingte) erfolgreicher zu bekämpfen als mit α -Methyl-dopa.

Chemisch gesehen verringert das Anhängen eines aliphatischen Restes und das Aufheben der Ionenstruktur die Wasserlöslichkeit des Amins. Acetylierung von OH- und NH_2 -Gruppen dient der organischen Chemie zum Schutz dieser Gruppen.

Diese chemischen Daten haben ihre biochemischen Folgerungen: Die Acetylierung schützt das Amin vor dem Angriff der Monoaminoxidase. Es wird beim Menschen unverändert ausgeschieden. Bei den Insekten wird durch die Acetylierung das Diphenol bis zum Einbau in die Cuticula "konserviert". N-Acetyl dopamin kann nicht zum Indolring schließen und zum Melanin kondensieren.

Acetylierung als genereller Mechanismus des Brenzkatechinamin-Stoffwechsels wurde schon von WEISSBACH et al. postuliert (98). Die vorliegende Arbeit kann als weiterer Beweis dafür gelten. Dopamin, Noradrenalin und 3-O-Methyl-Adrenalin werden am Stickstoff acetyliert. Man könnte die Bildung von N-Acetyl-dopamin als Beispiel dafür ansehen, daß enzymatische Reaktionen während der Evolution nicht verloren gehen müssen. Bei Insekten und Säugetier steht N-Acetyl-dopamin im Tyrosinstoffwechsel. Das enzymatische Geschehen ist gleichartig. Auch die anderen Stoffwechselwege von Tyrosin und Dopa können gut verglichen werden. Die Stickstoffacetylierung dient jedoch bei verschiedenen Organismen ganz verschiedenen Aufgaben, - einmal dem Schutz vor dem enzymatischen Abbau (Melaninbildung), im anderen Falle der Inaktivierung biologisch hoch wirksamer Substanzen.

Zusammenfassung

N-Acetyl-dopamin wurde durch den Nachweis bei 2 Insektenarten, *Drosophila melanogaster* und *Schistocerca gregaria*, und beim Menschen als allgemeiner Metabolit wahrscheinlich gemacht.

Der Tyrosinstoffwechsel dieser Insekten wurde untersucht und N-Acetyl-dopamin als Metabolit von Tyrosin bewiesen. Dabei ergab sich, daß bei beiden Insekten der Decarboxylierung zum Amin und Biosynthese von N-Acetyl-dopamin ein Abbau zu Phenolcarbonsäuren gegenübersteht. Der Abbau hat seinen Ort in vielen Geweben, die Bildung der Acetylamine geht nur in der Epidermis vor sich. Folgende Substanzen wurden bei *Schistocerca* als Metaboliten aufgefunden:

N-Acetyl-dopamin
N-Acetyl-tyramin
Dopamin
Tyramin
Dopa
Tyrosin
p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure
p-Hydroxybenzoesäure
(p-Hydroxyphenylpropionsäure)
Histidin

Darüber hinaus wurde eine Reihe noch unbekannter Metaboliten durch Spektrum oder Rf-Werte charakterisiert.

Der Insektenentwicklung gehen Änderungen im Stoffwechsel parallel. Bei *Schistocerca* konnten vor und nach der Häutung Maxima der Decarboxylaseaktivität festgestellt werden. Die Aktivität der Aminoxydase verläuft entgegengesetzt. Die Acetylierung desamins wird von den Zellen der Epidermis bewerkstelligt. Die Bedeutung von N-Acetyl-dopamin für die Cuticu-

lahärtung auch dieser Insekten wurde gezeigt und versucht, einen Einblick in den Mechanismus der Sklerotisierung zu erhalten. Dipteren und Orthopteren scheinen ihre Cuticula nach verschiedenem Mechanismus zu härten. Mutanten von *Drosophila* und *Schistocerca* zeigen keine Unterschiede in den untersuchten Stoffwechselschritten.

Verschiedene Säugetiergewebe, sowie menschlicher Harn, wurden auf N-Acetyl-dopamin untersucht. Der Nachweis gelang bei einem Patienten mit bösartigem Phäochromocytom. Das Vorkommen von N-Acetyl-noradrenalin, einer bisher meines Wissens unbekannten Substanz, im gleichen Urin wurde sehr wahrscheinlich gemacht. Derselbe Patient schied zudem eine größere Menge Protocatechualdehyd und ein Diphenol aus, bei dem es sich um 3,4-Dihydroxy-benzylalkohol gehandelt haben kann, sowie wahrscheinlich Dihydroxyphenylmethan. Diese drei Verbindungen sowie N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin wurden zum ersten Mal beim Menschen beschrieben.

N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin sind pharmakologisch inaktiv.

Die eventuelle Bedeutung der N-Acetylierung im Brenzkatechinamin-Stoffwechsel des Säugetierorganismus überhaupt wurde diskutiert. Aminacetylase-Aktivität wurde in Rinderleber und verschiedenen Insekten nachgewiesen.

Experimenteller Teil

Allgemeine Methodik

Apparate

Die UV-Spektren wurden auf einem Zeiss-Spektralphotometer FMQ 11 aufgenommen, der umgebaut werden konnte für fluorimetrische Messungen. Für die Aufnahme der Infra-Rot-Spektren: Perkin-Elmer-Spektralphotometer, Modell 21.

Die kernmagnetischen Resonanz-Spektren sind aufgenommen mit einem Varian NMR Spectrometer A 60.

Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Gerät von Friesseke & Höpfner, Modell FH 49, durchgeführt. Als Zählrohr diente ein Methandurchflußzähler, FH 407. Zur Messung auf Papierchromatogrammen stand der Radiopapierchromatograph FH 7452 mit automatischem Schreiber und Endfenster zur Verfügung.

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen wurden auf einem selbstgebauten Gerät durchgeführt.

Die Aminosäureanalysen wurden nach einer vollautomatischen quantitativen Methode von SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. und MOORE, St. mit Hilfe eines von HANNIG entwickelten Apparates der Firma Bender & Hobein durchgeführt (90; 35).

Die Injektionen wurden mit einer Desaga-Mikroinjektionsspritze durchgeführt, in manchen Fällen mit einer feineren Spritze nach BERGOLD (8).

Papierchromatographie

Papier: Whatman Nr. 4

Macherey und Nagel MN 2214 FF

Art: aufsteigend, ein- und zweidimensional

Systeme: I, Standardsystem, Butanol-Eisessig-Wasser = 4:1:5 v/v

II, Butanol, mit 1 n HCl gesättigt, zur Trennung Dopa-Dopamin

- | | | |
|---|---|-------------------------------------|
| III, Butanol, mit 0,5 n HCl gesättigt | } | für Brenzkatechinamine |
| IV, Phenol, mit 1 n HCl gesättigt | | |
| V, Benzol-Propionsäure-Wasser = 2:1:1 v/v | } | für
phenolische
Säuren |
| VI, Benzol-Propionsäure-Wasser = 2:2:1 v/v | | |
| VII, Isopropanol-Ammoniak-Wasser = 8:1:1 | | |
| VIII, Butanol-Pyridin-Dioxan-Wasser = 70:20:5:5 v/v | | |
| IX, Toluol-Essigsäureäthylester-Methanol-Wasser v/v
für acetylierte Verbindungen | | |
| X, 60 % wässriges Aceton | | |
| XI, 65 % wässriges Pyridin | | |
| XII, Butanol-Pyridin-Wasser, gesättigt mit NaCl = 1:1:2 v/v | | |
| XIII, n-Butyl-Äther, wassergesättigt, für Aldehyde und Ketone | | |
| XIV, Butanol-Propionsäure-Wasser = 4:1:5 | | |
| XV, 20 % wässrige KCl | | |
| XVI, 16 % HCl | | |
| XVII, 3 % Essigsäure | | |
| XVIII, Methyläthylketon, wassergesättigt | | |
| XIX, Butanol-Pyridin-Wasser = 1:1:1 v/v | | |
| XX, Butanol-n-Propanol-Wasser = 1:2:1 v/v | | |
| XXI, Butanol-Pyridin-Wasser = 140:30:30 v/v | | |
| XXII, Äther-Eisessig-Wasser = 156:36:12 | | |
| XXIII, Eisessig - 5% Butanol in Chloroform-H ₂ O = | } | für nieder-
molekulare
Säuren |
| 10:100:100 (Lit. bei 20; 53) | | |
| XXIV, Äthanol-Ammoniak-Wasser | | |
| XXV, Methyläthylketon-Propionsäure-Wasser = 75:25:30 | | |

Dünnschichtchromatographie

Beschichtung mit Kieselgel G und H nach STAHL (92), und Aluminiumoxyd G.

Schichtdicke 0,2 mm

Laufmittel: Essigsäureäthylester, 40 % Methanol in Essigester
und 15 % benzol. Methanol

Färbungen:

Für die Entwicklung der Chromatogramme wurden folgende Färbereagentien verwendet:

- (a) Diazotierte Sulfanilsäure (0,1 g Diazoniumsalz in 20 ml 10 % Na_2CO_3) zum Nachweis von Phenolen und anderen kupplungsfähigen Substanzen (= Pauly's Reagens),
- (b) Ammoniakalische Silbernitratlösung für reduzierende Substanzen (71),
- (c) 0,25 % Ninhydrin in Butanol für Aminogruppen,
- (d) 0,1 % 1,2-Nitrosonaphthol in Äthanol für p-substituierte Phenole (34),
- (e) 0,1 % 2,6-Dichlorochinon-chloroimid in Äthanol für p-unsubstituierte Phenole u.a. (23),
- (f) Folin's Reagens für phenolische Substanzen,
- (g) 0,1 % FeCl_3 für phenolische Substanzen,
- (h) 0,44 % Kaliumferricyanid in Phosphatpuffer pH 7,8 für Brenzkatechinamine (u.a. indolringschließende Substanzen) (38),
- (i) Kaliumferricyanidfärbung nach Trocknen mit Fe(III)SO_4 -Lösung (5 g Fe(III)SO_4 + 75 ml 85 % H_3PO_4 im $\text{L H}_2\text{O}$) besprühen für Brenzkatechinamine (27),
- (j) Na- β -naphthochinon-4-sulfonat in Boratpuffer (pH 8,9) für Brenzkatechinamine (27),
- (k) Nachweis der C-N-Bindung durch Chlorierung mit Cl_2 und Besprühen mit Lösung Stärke-KJ (77),
- (l) Tert. Butylhypochlorit zur Reaktion mit C-N-Bindungen (63),
- (m) Anilinhydrogenphthalat (0,93 g Anilin, 1,66 g Phthalsäure in 100 ml Butanol) zum Nachweis von Aldohexosen und Aldopentosen (72),
- (n) Indikatorfärbungen, allg. Nachweis von Säuren auf dem Papier, Bromkresol etc.,
- (o) 2,4 Dinitrophenylhydrazin für Aldehyd- und Keto-gruppierungen.

Radioaktive Substanzen wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, und der California Corporation for Biochemical Research bezogen:

generell markiertes C^{14} -L-Tyrosin
L-Tyrosin-Carboxyl- C^{14}

2'-C¹⁴-D, L-Dopa

2'-C¹⁴-Dopamin

2'-C¹⁴-Tryptophan

2'-C¹⁴-Tyramin

3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylglykol und 3-O-Methylnoradrenalin wurden uns freundlicherweise von Julius Axelrod, National Institute of Health, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt.

Synthesen

Herstellung von N-Acetyl-dopamin (84)

500 mg Dopaminhydrochlorid wurden mit 5 ml Tetrahydrofuran und 5 ml Essigsäureanhydrid 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Der Rückstand nach Rotationsverdampfen wurde in 10 ml 20%iger äthanolischer HCl aufgenommen und 24 Stunden bei 0°C stehen gelassen. Der Erfolg wurde durch Papierchromatographie in I geprüft und das Produkt durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd Woelm (Aktivitätsstufe I) gereinigt. Verschiedene Fraktionen wurden durch Elution mit Essigester, dann Essigester-Methanol (1:1) erhalten. Ausbeute etwa 80 % der Theorie.

Die Fraktionen wurden papierchromatographisch geprüft, von der reinsten ein IR-Spektrum angefertigt. Im Vakuum konnte N-Acetyl-dopamin in Kristallen erhalten werden, die aber beim Herausnehmen zerfielen.

Herstellung von N-Acetyl-noradrenalin

100 mg Noradrenalinhydrochlorid wurden in 2 ml Tetrahydrofuran (wasserfrei) gelöst und mit 4 ml Essigsäureanhydrid 4-5 Std. unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand mit 40 ml äthan. HCl (24 ml konz. HCl in 16 ml abs. Äthanol) 24 Stunden in der Kälte hydrolysiert. Bei unvollständiger Hydrolyse bleiben Diazetate und Triazetate im Gemisch. Der Rückstand wurde rotationsverdampft erhalten und wie oben über eine Al_2O_3 -Säule gereinigt.

Etwa 90 mg N-Acetyl-noradrenalin wurden erhalten, davon 40 mg kristallin.

Das IR-Spektrum wurde in KBr gemessen.

Herstellung von 3,4-Dihydroxyphenyläthan (Äthylbrenzkatechin)

250 mg 4-Chloracetyl-brenzkatechin wurden mit 20 ml verd. HCl (Konz. HCl : Wasser = 1:2) und amalgamiertem Zink (aus Hg und $ZnCl_2$) 4 Std. unter Rückfluß gekocht. Jede halbe Stunde wurden weitere 20 ml HCl

zugegeben. Der Überstand wurde dekantiert und ausgeäthert. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wurde die Ätherphase eingedampft. Im Exsiccator wurde nachgetrocknet. Zurück blieb eine dunkelbraune Schmiere, deren Eigenschaften durch Infrarot-Spektrum, UV und Chromatographie geprüft wurden. Theoretisch sollte das Öl hellgelb mit Siedepunkt $172-175^\circ$ sein. (Lit. bei 39).

Isolierung von N-Acetyl-dopamin aus Calliphoralarven

200 g 7-8 Tage alte Calliphoralarven wurden gewaschen und mit 500 ml 80 % Methanol im Starmix homogenisiert und 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde rotationsverdampft, der Rückstand daraus auf großen Bögen präparativ papierchromatographiert (in I; Rechromatographie in II). Eluiert wurde aus dem Papier mit Wasser.

Herstellung von p-Hydroxyphenylpropionsäure

1 g 4-Hydroxycimtsäure wurde in 80-90 ml 10 % NaOH 12 Stunden mit Überschuß Natriumamalgalan gerührt und anschließend filtriert. Nach Ansäuern mit HCl wurden die Säuren ausgeäthert, der Äther getrocknet mit Na-Sulfat und eingedampft. Der Rückstand erwies sich als reine kristalline p-Hydroxyphenylpropionsäure, er schmolz zwischen 124 und 130°C . Nach Umkristallisieren aus Essigsäureäthylester-Benzol wurden weiße Kristalle vom Fp. = 127° erhalten. Ausbeute über 85 %.

Herstellung von p-Hydroxyphenylpropionsäure(-generell- C^{14}) aus Tyrosin(-gen.- C^{14}) durch Calliphora-Transaminase

2 g 4 Tage alte Calliphoralarven wurden in 20 ml eiskaltem Phosphatpuffer vom pH 7,2 mit 200 mg Ascorbinsäure (neutralisiert zugegeben) homogenisiert (im Homogenisator nach POTTER). Die Debris wurden 15 Min. bei 3000 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand diente als Transaminasepräparat.

Der Inkubationsansatz: 5 mg L-Tyrosin
 140 (= 8 μC) L-Tyrosin-gen. C^{14}

10 ml Phosphatpuffer pH 7,2

5 ml Enzympräparat

Inkubiert wurde unter Stickstoff 12 Std. bei 37°C.

Die Reaktion wurde durch Methanol abgebrochen, das Gemisch filtriert und das Filtrat ausgeäthert. Der Rückstand aus dem Äther wurde aus Essigester-Benzol umkristallisiert. Leider betrug die Ausbeute nur 1 µg. Die Tiere hatten unerklärlicherweise ihren Stoffwechsel schon umgesteuert.

3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure wurde aus Dihydroxyphenylbrenztraubensäure durch Reduktion mit Na-Amalgam hergestellt. Die Ausbeute war gering.

3,4-Dihydroxyphenylessigsäure wurde aus Dihydroxyphenylbrenztraubensäure durch Hitzedecarboxylierung gewonnen. 20 mg Dihydroxyphenylbrenztraubensäure wurden mit Überschuß β -Methyl-naphthyläther im Glasröhrchen eingeschmolzen und längere Zeit auf 200°C erhitzt. Mit Petroläther wurde extrahiert. Das gewünschte Produkt blieb zurück.

Hydrochinondiazetat

10 g Hydrochinon wurden in 32 g Essigsäureanhydrid mit 0,72 ml konz. H_2SO_4 gerührt und in Eiswasser gegossen. Umkristallisiert wurde aus Methanol-Wasser, der Erfolg durch IR-Spektrum geprüft. Fp = 124.

1,2,4-Trihydroxybenzol

1 g p-Chinon wurde allmählich zu 10 ml Essigsäureanhydrid gegeben, das mit 0,35 ml konz. Schwefelsäure und einigen Tropfen Essigsäure versetzt war. Die Lösung wurde warm unter Rühren. Im Eiswasser erstarrte eine kristalline Masse, die aus Methanol-Wasser umkristallisiert wurde. Es blieben 1,58 g Kristalle vom Fp = 98°C. Das entstandene Triacetat wurde IR-spektroskopisch geprüft.

500 mg Triacetat wurden in 2 ml Methanol mit 0,2 ml konz. HCl 3 Std. unter Rückfluß gekocht. Nach Rotationsverdampfen wurden die kristallinen Reste im Exsiccator getrocknet. Schmelzpunkt (140) und Infrarot-

spektrum lieferten die gewünschten Werte.

Herstellung von Acetyl-Coenzym A

- 1) Chemisch: Eine wässrige Lösung von Coenzym A wurde mit Bicarbonat auf pH 7,5 bis 8,0 gebracht. Bis zu einem Überschuß von 10-20 % wurde Essigsäureanhydrid zugegeben und geschüttelt, bis keine freien SH-Gruppen mehr nachweisbar waren. Nach Ansäuern wurde ausgeäthert.

Die SH-Gruppen wurden mit einer 1 % wässr. Nitroprussidnatrium-Lösung nachgewiesen. Die positive Reaktion ergibt im Alkalischen eine weinrote Farbe.

(DECKER, "Die aktivierte Essigsäure", (21)).

- 2) Eine Transacetylase, die Phosphattransacetylase (EC 2.3.1.8.) aus *Clostridium kluyveri*, wurde aus den getrockneten Zellen nach STADTMAN und BARKER (91) präpariert. Die Enzympräparation übertrug bei kurzer Inkubation den Acetylrest von Acetylphosphat (Dilithiumsalz) auf Coenzym A.

Generell C¹⁴-markiertes Dopa aus Tyrosin-gen.C¹⁴

8 Tage alte Calliphoralarven in Phosphatpuffer vom pH 7,2 (M/15) homogenisiert mit 100 mg Ascorbinsäure, die vorher neutralisiert worden war. Die 20%igen Homogenate wurden bei 1250 x g zentrifugiert und der Überstand in der Spinco Ultrazentrifuge 1 Std. bei 105 000 g nochmals zentrifugiert. Der Niederschlag wurde suspendiert in Phosphatpuffer vom pH 7,2 und als Enzympräparat für die Inkubation verwandt. Aktives Tyrosin wurde mit 5 mg Ascorbinsäure im ml in der Suspension inkubiert, 2 Std. bei 37°C. Die Reaktion wurde mit Methanol gestoppt, die gefällten Eiweiße abzentrifugiert und der Überstand rotationsverdampft. Durch Papierchromatographie in II wurde Dopa von Tyrosin getrennt. Die Ausbeute war 61 %. Das aktive Tyrosin wurde aus den Chromatogrammen zurückgewonnen. Nebenprodukte waren keine aufgetreten.

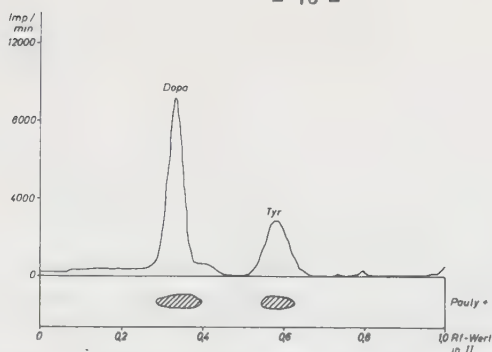


Abb. 38 Umwandlung von Tyrosin zu Dopa durch ein Enzympräparat aus *Calliphoralarven*

Die strukturelle Lokalisation der Hydroxylase bei *Calliphora* wurde von SEKERIS und KARLSON untersucht (87).

Herstellung von 3,4-Dihydroxyphenyläthylglykol

4-Chloracetyl-brenzkatechin wurde in 50 ml Essigsäureanhydrid und mit 2 g wasserfreiem Kaliumacetat versetzt, über schwacher Flamme erhitzt und 15 Min. sieden gelassen. Anschließend wurde am Rückfluß 40 Min. gekocht und das Gemisch in Eiswasser gekippt. Eine gallertige Masse erstarrte im Eisschrank bei 0°. Umkristallisiert wurde aus Essigsäure/H₂O. Das entstandene Triacetat hatte einen Schmelzpunkt von 92°C.

3 Versuche wurden gemacht, die Verbindung zu hydrieren:

1) 800 mg Triacetat wurde in 1 n NaOH (10 ml) mit Natriumamalgam über Nacht geschüttelt. Es wurde filtriert und ausgeäthert. Der rote Rückstand gab jedoch noch ein Dinitrophenylhydrazon.

2) und 3)

2,4 g Triacetat wurden in Äther suspendiert. LiAl-Hydrid wurde in 50 ml Äther gelöst, zum Teil auch in Tetrahydrofuran, und tropfenweise zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren wurde Wasser unter Eiskühlung zugegeben. 3mal wurde mit Äther extrahiert und der Äther getrocknet über Na-Sulfat und verdampft. Weiße Kristalle blieben im Rückstand, ließen sich aber nicht mehr gewinnen durch Umkristallisieren. Das IR-Schmierogramm des Öls bestätigte, daß die Hydrierung

partiell gelungen war. Die Reinigung durch Dünnschichtchromatographie mißlang.

3,4-Dihydroxybenzylalkohol

- 1) 720 mg 3,4-Dihydroxybenzoesäure wurde in 1,8 ml Dihydropyran und 4 µl konz. HCl, die allmählich zugegeben wurden, gelöst. (Zur Lösung wurden entgegen der Vorschrift nochmals 1 ml Dihydropyran und 5 µl HCl gebraucht.) 24 Std. wurde geschüttelt. 5 ml Äther wurden zugegeben und mit Wasser gewaschen, der Ätherteil rotationsverdampft bis zu einem öligen, gelben Rückstand; dieser wurde in 15 ml Äther gelöst und auf 240 mg Lithium-Aluminium-Hydrid getropft, dann gerührt mit Kühleraufsatz für 4 Std. Langsam unter Eiskühlung wurde Eis zugeschüttet und 3mal ausgeäthert. Die Ätherphase wurde getrocknet und zu einem gelben Öl eingedampft. Dieses wurde in 2 n HCl aufgenommen und zur Hydrolyse zwei Std. in die Kälte gestellt. Kurz wurde auf 50° erhitzt und ausgeäthert. Die Ätherphase wurde mit einer 2 n wässrigen Na₂CO₃-Lösung geschüttelt zur Entfernung nicht reagierter Säure. Aus dem Äther wurde eine braunrote Schmiere gewonnen, die aus Essigester/Benzol umkristallisiert wurde. Elektrophorese und IR-Spektrum bestätigten das Produkt. (Lit. zum OH-Schutz durch Dihydropyran siehe 70; 73)
- 2) Hydrierung von Protocatechualdehyd in Methanol mit Raney-Nickel, 100 Atm. H₂-Druck und 50°C hatte keinen Erfolg. Ein Versuch mit PtO₂ war ebenso erfolglos.

Die Versuchstiere

Insekten ⁺):

Calliphora erythrocephala, eine der Schmeißfliegen, die zur Ordnung der Dipteren (Zweiflügler) zählen. *Calliphora erythrocephala* gehört zu den höher entwickelten Insekten, den holometabolen, die vom Larvenstadium zum erwachsenen Insekt über eine Puppendiapause differenzieren. Die Larven sind vor der Verpuppung 12-15 mm lang und kontrahieren sich, die Larvenouticula wird in eine harte, dunkelbraune Puppencuticula umgewandelt. Das larvale Leben nach dem Schlüpfen aus dem Ei dauert 8 Tage, das Puppenstadium ist das 4. Stadium und dauert 11 Tage.

Die Schmeißfliegen stammten aus der institutseigenen Massenzucht.

Drosophila melanogaster: Die Taufliegen gehören ebenfalls zu den Dipteren, haben aber einen schnelleren Lebenszyklus. Sie verpuppen schon nach 5 Tagen. Die Larve ist kurz vor der Verpuppung nicht länger als 2 mm.

Ich erhielt die Taufliegenpärchen, wild und von den Mutanten *ebony* und *white*, von Frl. Langwaldt aus dem Zoologischen Institut der Universität München. Die übrigen Mutanten wurden mir von Dr. Robert Springer, Institut für Allg. Biologie Wien, zugesandt: *ltr* = *letal translucida*, *dp b* / *dp b* = *dumpy* (verkürzte Flügel), *black* (dunkles Pigment) und *brown-ebony*. Die Nährböden wurden aus Trockenzwetschgen und Agar-agar hergestellt.

Schistocerca gregaria (Forsk.): Ordnung Geradflügler, Orthoptera. Sie gehören zu den hemimetabolen Insekten, die keine vollkommene Verwandlung, kein Puppenstadium, durchmachen. 5 larvale Stadien wechseln einander ab. Schon im ersten larvalen Stadium haben sie imaginale Gestalt. Die Larvenouticula wird gehör-

⁺) Eine Zusammenfassung des augenblicklichen Wissens über die Metamorphose dieser Insekten gaben kürzlich KARLSON und SEKERIS (46).



Abb. 39 Schistocerca-Imago

tet, am Ende des Stadiums abgestreift und durch eine neue ersetzt. Das Ablösen der alten Cuticula (Exuvie) wird durch proteolytische Enzyme bewerkstelligt, die von der Epidermis als Exuvialflüssigkeit abgegeben werden.

Die Wildform *Schistocerca* und eine Albinomutante erhielt ich vom Anti-Locust Research Centre London. Die Albinomutante war dort zum ersten Mal gezüchtet worden (36).

Die Fütterung und Haltung der Heuschrecken folgte den Angaben von HUNTER-JONES (37).

Dauer der larvalen Stadien bei 30-32°C:

	1.Stadium	2.	3.	4.	5.larvales St.
Normal- tiere	5 Tage	3-4	3-4	4-5	8 Tage
Albino- mutante	5 Tage	4	4	5	8-9 Tage

Herrn Dr. Haskell, Anti-Locust-Research Centre London,
Dr. Springer und Frl. Langwaldt möchte ich hier besonders
danken für die Überlassung von Tiermaterial.

Mäuse und Ratten:

Weiß und graue Mäuse, sowie junge Ratten, entstammten der
Zucht des Max-Planck-Instituts für Biochemie.

Beschreibung der Versuche

Teil I: Insekten

A. Zum Nachweis von N-Acetyl-dopamin im Tyrosinstoffwechsel

1) Versuche mit Drosophila

Fütterung mit Tyrosin-generell-C¹⁴:

Etwa 50 Larven der Wildform wurden auf einem mit Tyrosin-gen.-C¹⁴ versehenen Nährboden (aus getrockneten Pflaumen) großgezogen und kurz vor der Verpuppung aufgesammelt und in 80 % Methanol homogenisiert. Der Rückstand nach Verdampfen wurde im System I papierchromatographiert. Die Aktivitätsverteilung ergab folgendes Bild:

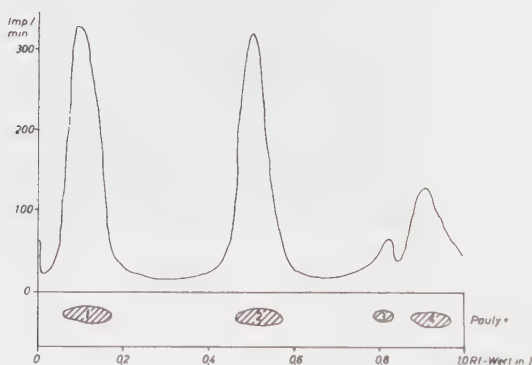


Abb. 40 Umwandlungen von Tyrosin bei Drosophila

- 1: Wahrscheinlich identisch mit einem auch bei Calliphora beobachteten Metaboliten. Die Struktur ist noch nicht bekannt.
- 2: Tyrosin, vorwiegend aus dem Nährboden.
- 3: reagiert mit AgNO₃ positiv, im UV-Licht ist eine Absorption sichtbar. Mit der Identifizierung von 4 kann als ziemlich sicher gelten, daß es sich hierbei um N-Acetyl-dopamin handelt.

4: reagiert mit Silbernitrat nicht. Die Hydrolyse ergab Tyramin, wie Elektrophorese und Färbungen zeigten.

Die Höhe der Aktivitätsgipfel über dem Chromatogramm gibt kein Maß für die Umwandlung, da auch Tyrosin aus dem Nährboden mit chromatographiert wurde. Die Umwandlung ist größer als Abb. 40 darstellt.

Versuche mit nicht markiertem Tyrosin und Fütterung mit Dopa-2-C¹⁴ brachten keine weiteren Ergebnisse.

Dopa-Decarboxylaseaktivität:

Je 10 Tiere wurden mit 0,1 ml Phosphatpuffer vom pH 7,2 (m/15) mit einer Pistille homogenisiert und direkt mit etwa 50 000 Imp/Min Dopa-2-C¹⁴ versetzt. Inkubiert wurde in N₂-Atmosphäre 1 Std. bei 37°C. Der Überstand wurde direkt chromatographiert im System I und die Aktivitätsverteilung gemessen. Die Fläche unter den Aktivitätspeaks wurde ausplanimetriert und die Flächenmaßzahlen als Maß für die Menge der Substanz verwendet. Die Umwandlungen von Dopa zu Dopamin betrugen zwischen 10 und 50 %. Beispiel der Aktivitätsverteilung über dem Papierchromatogramm:

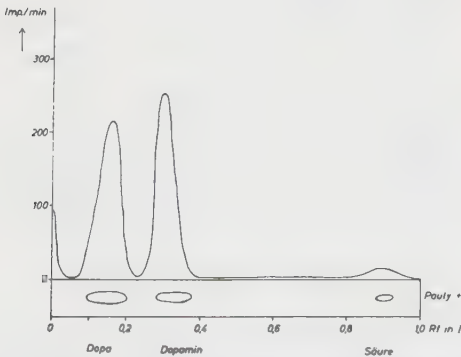


Abb. 41 Radiochromatogramm des Inkubationsgemisches mit *Drosophila*-Enzymen

2) Schistocerca

- a) An aktivem Material wurde durchschnittlich 60 000 bis 100 000 Imp. pro Min. und Heuschrecke injiziert.

Gesamthomogenate von Heuschrecken wurden in 80 % Methanol hergestellt, zentrifugiert und damit von Eiweiß und Debris abgetrennt. Der Überstand wurde rotationsverdampft, der Rückstand in Methanol aufgenommen und im System I papierchromatographiert.

Zum Nachweis in den Epidermiszellen wurden Tiere 5-7 Std. nach der Injektion von Tyrosin bzw. Dopa getötet und Epidermis + Cuticula vom Körperinneren freipräpariert. Das Homogenat wurde wie oben hergestellt. Der Überstand aus dem Cuticulahomogenat sollte hauptsächlich die löslichen Bestandteile der Epidermiszellen enthalten.

Nachweis von Dopamin: Reaktion mit AgNO_3 . Rf-Wert in IV = 0,6, elektrophoretische Wanderung.

von Tyramin: UV-Maxima bei 210 und 260 m μ , Elektrophorese, Rf-Werte in I, IV, XXV.

von N-Acetyl-dopamin: UV-Maxima bei 207 und 275 m μ , Hydrolyse und Nachweis von Dopamin im Hydrolysat (wegen HCl Rf-Wert in I = 0,45, Absorption unter der UV-Lampe, Reaktionen mit Eisencyanid, Eisencyanid + Eisen(III)sulfat, AgNO_3 , Diazo-reagens und Ninhydrin).

von N-Acetyl-tyramin: Hydrolyse des Flecks mit dem Rf-Wert 0,85 und Nachweis von Tyramin im Hydrolysat (Rf-Wert in I = 0,65, Reaktion mit Ninhydrin).

Im Homogenat des Körperinneren wurde eine Säure elektrophoretisch nachgewiesen.

- b) Katabolischer Stoffwechsel.

Wie oben wurde radioaktives Ausgangsmaterial injiziert und in verschiedenen Abständen nach der Injektion aufgearbeitet. In der Zeit zwischen Injektion und Tod des Versuchstiers wurde der Kot gesammelt, um auch die Ausscheidungsprodukte erfassen zu können. Der Kot wurde ebenso in 80 % Methanol homogenisiert, zentrifugiert und der Über-

stand eingedampft. Der Rückstand wurde papierchromatographisch in System I aufgetrennt.

Insgesamt wurden über 200 Auswertungen gemacht. Die Versuche zur Identifizierung werden nachfolgend beschrieben:

Metaboliten nach Injektion von Tyrosin-generell- C^{14} :

Die Rf-Werte und Numerierung siehe Abb. 11, S. 15.

Substanz 1: Dopa. Die Gesamtaktivität zwischen Rf = 0,1 und Rf = 0,3 wurde eluiert und in verschiedenen Systemen rechromatographiert. Dopa trennte dabei ab und hatte die Rf-Werte: 0,1 - 0,2 in II, 0,19 in IV. Es wanderte nicht in der Elektrophorese bei pH 6,8, die Färbungen stimmten überein.

2: Dopamin, wie Elektrophorese und Rf-Wert in IV (0,5 - 0,6) zeigten, siehe Abschnitt a. Keine Reaktion mit Dichlorochinonchlorimid.

3: Injiziertes Tyrosin.

4: läßt sich durch Elektrophorese von den ungeladenen Metaboliten gleichen Rf-Wertes abtrennen. Es wandert wie Tyramin. Es gibt die typischen Färbungen mit α -Nitrosos-naphthol, Ninhydrin, Diazoreagens. Silbernitrat und Eisencyanid werden nicht reduziert.

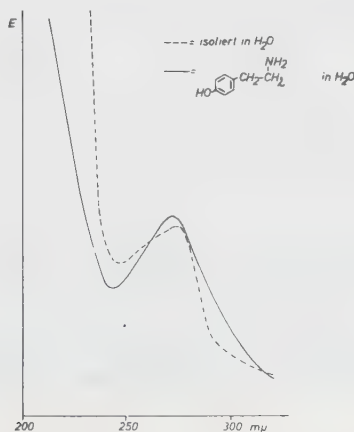


Abb. 42

UV-Spektrum des isolierten Tyramin im Vergleich zu authentischem.

- 5: fraglich, ob mit 6 identisch. Die Vermutung beruht auf Rf-Wertunterschieden, die durch Färbung sichtbar gemacht werden können.
- 6: Regelmäßig auftretendes p-substituiertes Monophenol (wie die Färbungen zeigten), das deshalb wahrscheinlich dem Tyrosinabbau angehört. Es ist in der Elektrophorese nicht zum Wandern zu bringen. Hydrolyse ändert die chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften nicht. Milde Oxydation gelang nicht. Auf den Chromatogrammen fluoreszierte der Fleck blau im UV-Licht ("0,7-Substanz").

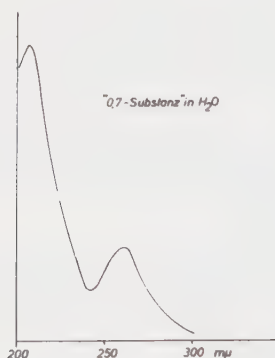


Abb. 43

UV-Spektrum
der "0,7-Substanz"

- 7: Das Chromatogramm aus dem Homogenat einer Imago der Albino-mutante zeigte folgende Aktivitätsverteilung:
- Der Komplex vom Rf-Wert 0,8 - 0,9 wurde der Hydrolyse unterworfen mit 4 n HCl, bei 100°C, 6 Std. Der Rückstand des Hydrolyсата wurde rechromatographiert im gleichen System I. Zwei neue Substanzen sind durch die Hydrolyse entstanden. Der eine Fleck, bei Rf 0,35, färbte mit Pauly's Reagens orange, enthält also einen aromatischen Ring - da entstanden aus Tyrosin, wohl ein p-substituiertes Monophenol. In der Elektrophorese bei pH 6,8 wandert die Substanz nicht. - Der größere Peak bei 0,45 gab keine Färbung mit Diazoreagens. Die Färbung wurde mehrmals versucht. Es kann als sicher gelten, daß kein aromatischer Ring mehr vorhanden war. Die "0,45-Substanz" erwies sich in der

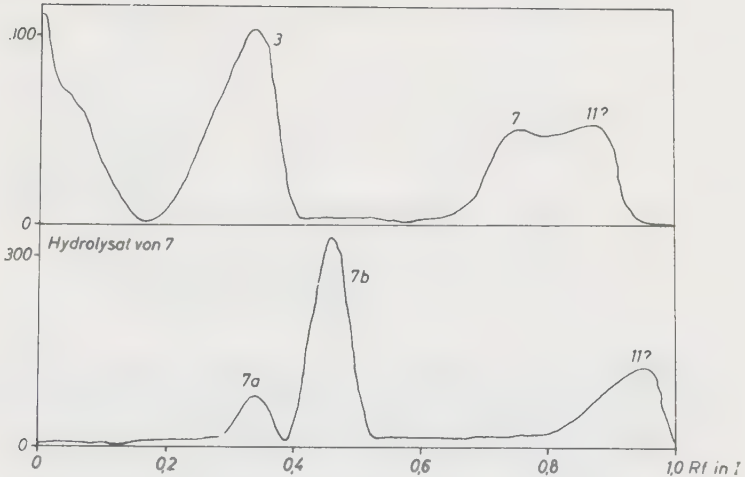


Abb. 44 Umwandlung von Tyrosin bei einer Albino-Imago von *Schistocerca* (Chromatogramm)

Elektrophorese als Säure. Sie wanderte relativ weiter als aromatische Säure. Die Säure hatte kein UV-Spektrum. Chromatographische Analyse wurde versucht, scheiterte aber an der geringen Menge.

Das UV-Spektrum vor der Hydrolyse hatte nur eine Schulter zwischen 265 und 275 m μ . Das kann jedoch auch von der bei 0,9 verbleibenden Substanz herrühren. Das UV-Spektrum der 0,35-Substanz ist besser verwertbar.

Es handelte sich also um den Ester einer Säure, die wahrscheinlich aliphatisch war, vielleicht mit der aromatischen 0,35-Substanz.

8: Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin auch im Gesamthomogenat wurde schon in Kapitel a berichtet. Der Nachweis wurde geführt durch

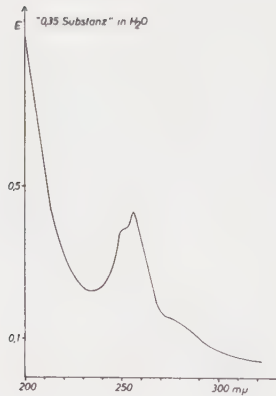


Abb. 45

UV-Spektrum der
"0,35-Substanz".

Vergleich der Rf-Werte in I und II, $AgNO_3$ -Färbung und Hydrolyse mit Nachweis von Dopamin im Hydrolysat (Elektrophorese, Färbung mit Eisencyanid-Eisensulfat, Rf-Wert).

- 9: In Homogenaten aus dem 5. Stadium vor der Häutung konnte N-Acetyl-tyramin in geringen Mengen gefunden werden. Die Identifizierung gelang analog zu 8. Siehe auch Kapitel a!



Abb. 46

UV-Spektrum des
isolierten
N-Acetyl-tyramin

- 10: Einmal wurde aus einem Albinohomogenat während der letzten Häutung ein einziges Umwandlungsprodukt erhalten:

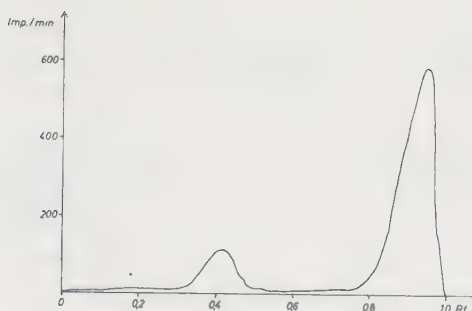


Abb. 47 Umwandlung von Tyrosin in Albinolarve während letzter Häutung

Trotz mehrerer 1000 counts auf mehreren Chromatogrammen gelang es nicht, die Aktivität auf Rechromatogrammen, dem Elektrophoresestreifen oder nach Hydrolyse wiederzufinden. Es ist möglich, daß es sich um eine flüchtige Substanz gehandelt hatte. Ich hatte mir keine Methode ausgearbeitet, flüchtige Säuren etc. zu binden.

- 11: Auf den meisten Chromatogrammen wurden bei $R_f = 0,9$ eine oder mehrere Säuren, aromatische Säuren, gefunden. So ist auch bei der Hydrolyse von 7 eine Säure bei 0,9 unverändert geblieben. In jeweils einem Fall wurde wahrscheinlich gemacht, daß es sich dabei um p-Hydroxyphenylelessigsäure (in I 0,9; in V 0,7) handelte, bei Substanz
- 12: um eine Säure, die mit keiner der geprüften übereinstimmte (Elektrophorese, R_f -Werte: in I 0,9; in V 0,6; in VII 0,95),
- 13: wahrscheinlich um p-Oxybenzoesäure, die schon durch die starke Gelbfärbung mit Diazoreagens und das Spektrum charakterisiert ist.

Im Kot nach Tyrosininjektion nachgewiesene Produkte:

- 14: (R_f -Wert = 0,3) wanderte in der Elektrophorese bei pH 6,8 nicht, das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei 252 m μ . Das Vorhandensein einer aromatischen Verbindung bewies die Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure.

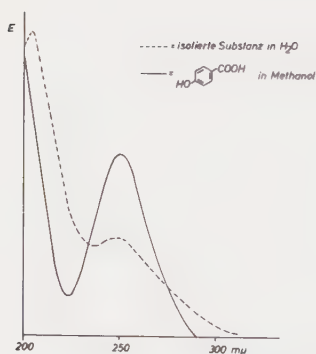


Abb. 48
UV-Spektrum der
isolierten
p-Oxybenzoesäure
aus dem Körper-
inneren

15: ($R_f = 0,3-0,4$) ist bei pH 6,8 negativ geladen, das UV-Maximum liegt bei 282 mμ.

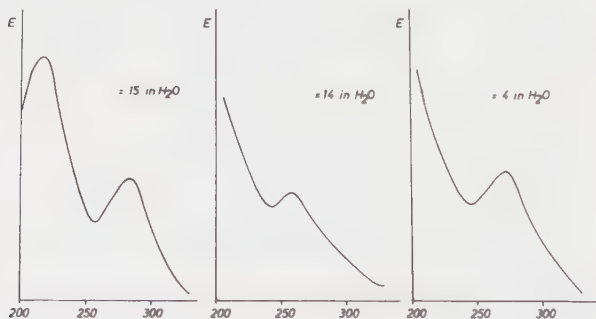


Abb. 49 UV-Spektren isolierter Ausscheidungsprodukte von
Schistocerca

Aus der Gegend um R_f -Wert 0,6 wurden durch die Elektrophorese drei Substanzen aufgetrennt:

4: bei pH 6,8 positiv geladen. Die R_f -Werte in I und XXV (0,80) stimmen mit denen von Tyramin überein. Dafür spricht auch das UV-Spektrum mit einem Maximum bei 275 mμ.

16: wandert in der Elektrophorese nicht. Die Substanz reagiert mit Diazoreagens, wurde aber nicht weiter untersucht. Sie könnte mit der ungeladenen Substanz gleichen Rf-Werts (Substanz 6) aus dem Heuschreckeninneren identisch sein.

17: Es handelt sich um eine phenolische Säure; dies läßt sich aus dem UV-Spektrum und der Reaktion mit Diazoreagens sagen.

Die Rf-Werte sind in I 0,63

in VI 0,00

in VIII 0,45

in XXVI 0,50

18: Das Vorkommen von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure im Kot wurde durch Elektrophorese, Diazofärbung (gelborange) und Rf-Werte in 5 Systemen wahrscheinlich gemacht:

in I 0,75-0,80 in VII 0,5 -0,55

in VI 0,30-0,40 in XIX 0,25, Schwanz

in VIII 0,15-0,20

Im UV-Spektrum zeigte sich ein Maximum bei 290 mμ.

19: wanderte im elektrischen Feld bei pH 6,8 nicht, reagierte mit Pauly's Reagens orangerot. Eine Hydrolyse wurde noch nicht versucht. Eigenartigerweise ließen sich die Substanzen 17 und 19 teilweise in der Ätherphase schütteln.

20: positiv geladen beim gleichen pH, reagierte aber nicht mit Diazoreagens, nicht weiter untersucht.

13: p-Oxybenzoesäure wurde mehrmals bei inaktiven Versuchen oder als aktives Ausscheidungsprodukt von Tyrosin nachgewiesen. Der Nachweis stützt sich auf das charakteristische UV-Spektrum, die Elektrophorese, die typische leuchtend-gelbe Färbung mit Diazoreagens und vergleichende Rf-Werte:

in I 0,95

in XV 0,65

in X 1,0

Als Beispiel ist ein Chromatogramm des Kothomogenats dem des Inneren gegenübergestellt.

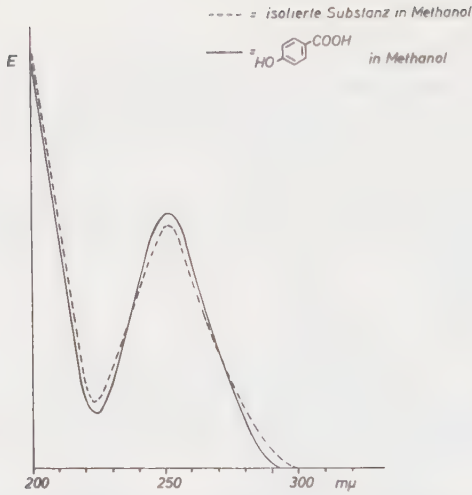


Abb. 50 UV-Spektrum isolierter p-Oxybenzoesäure aus *Schistocerca*-kot im Vergleich mit authentischer

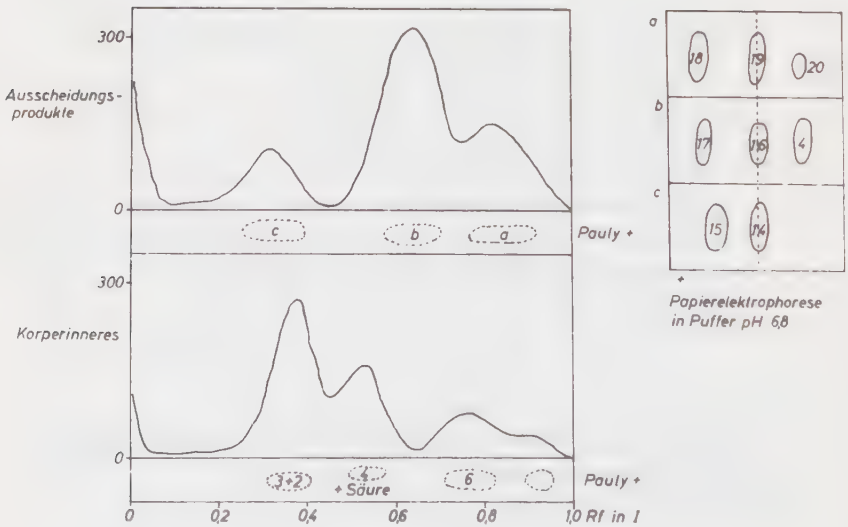


Abb. 51 Vergleich der Metaboliten im Körperinneren mit den Ausscheidungsprodukten von *Schistocerca* anhand von Chromatogrammen

Injektionen von Dopa-2-C¹⁴:

Beispiele der Aktivitätsverteilung über den Papierchromatogrammen:

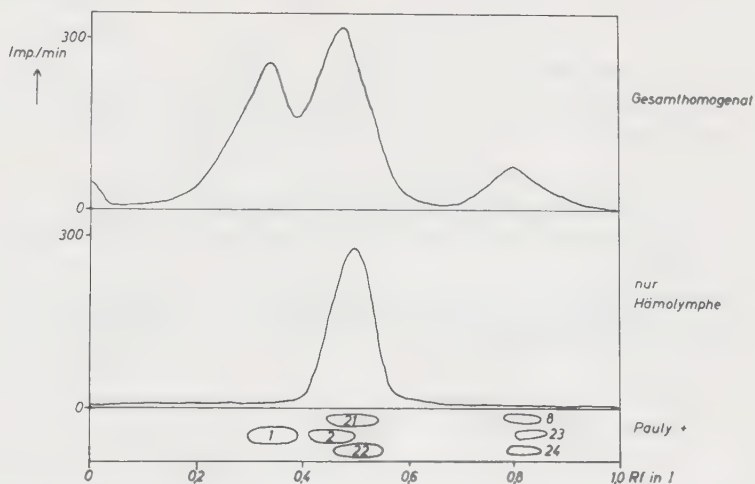


Abb. 52 Umwandlungen von Dopa in Schistocerca (Chromatogramme)

- 1: entspricht eingesetztem Dopa.
- 21: ($R_f = 0,6$) eine Säure, die als Diphenol Silbernitrat reduzierte und ein UV-Absorptionsmaximum von 287 mμ hat. Identifizierung steht noch aus.
- 2: Elektrophorese und Färbungen mit Silbernitrat und Eisencyanid bewiesen die Anwesenheit von Dopamin.
- 22: Eine ungeladene Verbindung mit demselben R_f -Wert 0,5 wurde eluiert und ein UV-Maximum von 270 mμ festgestellt. Diese Substanz reagiert ebenfalls mit Silbernitrat und Eisencyanid. Sie lässt sich durch β-Galaktosidase oder β-Glucosidase nicht spalten. Wird nach Dopa- oder auch Dopamin-2-C¹⁴-injektion die Hämolymphe des Insekts gewonnen und chromatographiert, ist diese ungeladene Substanz der einzige Metabolit.
- 23: Durch Elektrophorese wurden aus dem Fleck bei 0,8 drei Substanzen herausgetrennt. Die eine wanderte zur positiven Elektrode,

24: die andere zur negativen Elektrode,

8: die dritte blieb am Startpunkt. Alle drei reduzierten Silbernitrat. Nr. 8 wurde hydrolysiert und im Hydrolysat Dopamin nachgewiesen. Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin ist oben genau beschrieben.

Es gibt Anzeichen, daß auch Dopamin im Kot ausgeschieden werden kann. Ein Fleck bei 0,30 färbte mit Diazoreagens intensiv purpurrot, mit Eisencyanid rosa und reagierte nicht mit Nitrosonaphthal.

Injektion von p-Hydroxyphenylpropionsäure (gen.C¹⁴):

In wenigen Stunden nach der Injektion verschwand die Aktivität aus dem Inneren.

Im Kot wurden vier Produkte ausgeschieden neben unveränderter p-Hydroxyphenylpropionsäure.

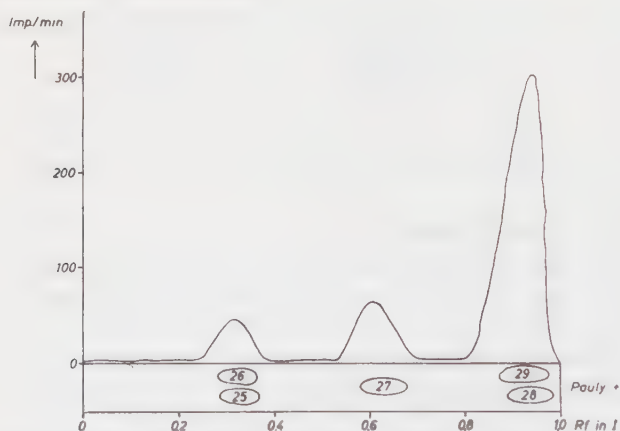


Abb. 53 Umwandlungs- und Ausscheidungsprodukte von p-Hydroxyphenylpropionsäure bei *Schistocerca*

Aus dem Hauptgipfel bei 0,90, der die injizierte-Propionsäure (= 29) enthält, wurde durch Elektrophorese eine bei pH 6,8 ungeladene Substanz abgetrennt (= 28).

Das Spektrum besagt schon, daß es sich beim Säureanteil nicht um p-Hydroxyphenylpropionsäure allein handeln kann.

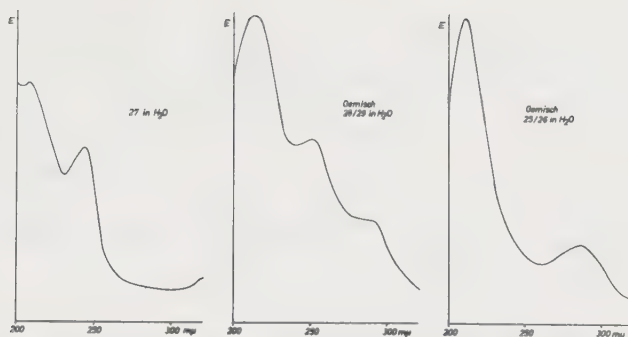


Abb. 54 UV-Spektren der Ausscheidungsprodukte von Abb. 53

Bei $R_f = 0,6$ wurde eine diazopositive Säure eluiert (Elektroph.: -). 27 hat ein Spektrum und R_f -Werte, die mit keiner der bekannten Säuren Ähnlichkeit haben.

R_f -Wert in I 0,6
in VI 0,05-0,08
in XXV 0,6 -0,65

Der Radioaktivitätsgipfel bei $R_f = 0,38$ trennte durch Elektrophorese in zwei diazopositive Substanzen (schwach positiv und schwach negativ geladen bei pH 6,8).

Freies Histidin bei Schistocerca:

Regelmäßig konnte durch die Färbung mit diazotierter Sulfanilsäure Histidin auf den Chromatogrammen der Gesamthomogenate entdeckt werden. Die R_f -Werte:

I 0,02-0,2
XI 0,7 -0,75

Zur Identifizierung diente im übrigen die Elektrophorese und die charakteristische Rotorange-Färbung mit Pauly's Reagens. Die Zeit zwischen Injektion und Aufarbeitung hatte keinen Einfluß auf das Muster auftretender Aktivitäten:

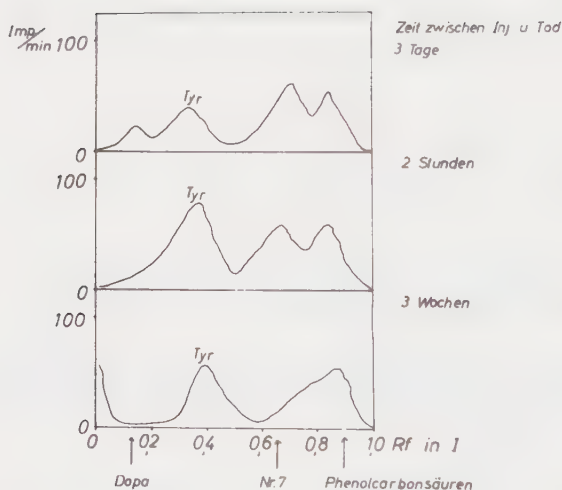


Abb. 55 Einfluß des zeitlichen Abstands zwischen Injektion und Aufarbeitung auf die Art und Höhe der Umwandlung

d) Der Tyrosinstoffwechsel in der larvalen Entwicklung

Die Maxima der Decarboxylase und Aminoxydase

Die Enzympräparation:

Flügel, Kopf und Beine wurden abgeschnitten; der Rumpf wurde in 10 ml eiskaltem Phosphatpuffer (pH 7,2; M/15)/g Tier homogenisiert. Vor der Homogenisation wurden 5 mg Phenylthioharnstoff (im Falle der Decarboxylase) oder 100 mg Ascorbinsäure (im Falle der Aminoxydase) zur Hemmung der Phenoloxydase zugegeben. Debris wurden abzentrifugiert bei 5000 x g 15 Min. Der Überstand diente als Enzympräparat. Die Inkubationen wurden sofort angesetzt. Bei Aufbewahren tritt auch in der Kälte leicht Aktivitätsverlust ein.

Als Substrate wurden eingesetzt: L-Tyrosin, DL-3,4-Dihydroxyphenyl-

alanin, Dopamin (3,4-Dihydroxy- β -phenyläthylamin), Tyramin, L-Tryptophan. Zu jedem Substrat wurden 0,005 μ c des entsprechenden radioaktiven Präparates zugesetzt. Das Enzympräparat wurde im offenen Erlenmeyer mit Substrat inkubiert. Nur die Inkubation mit Dopa wurde unter Stickstoff durchgeführt.

Der Inkubationsansatz: 1 mg inaktives Substrat
0,005 μ c aktives Substrat
1 ml Enzymlösung
2 ml Phosphatpuffer pH 7,2 (M/15)

Temperatur: 37°C; Dauer 12-15 Std.

Die Reaktion wurde mit Methanol gestoppt, das gefällte Eiweiß abfiltriert und das Reaktionsgemisch nach Einengen papierchromatographiert (aufsteigend, Whatman Nr. 4, in I). Die Umwandlungsprodukte wurden elektrophoretisch und durch Rf-Werte in verschiedenen Systemen geprüft, teilweise zusätzlich durch UV-Spektren. Die Aktivitätsverteilung über dem Papier wurde gemessen. Als Maß für den Umsatz an Substrat diente das Verhältnis der graphisch ermittelten Flächenmaßzahlen. Denn das Integral über die Aktivität der einzelnen Banden ist ein Maß für die jeweilige Gesamtaktivität.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf Seite 23 beschrieben.

Die bei der Inkubation entstandenen Amine wurden durch ihre elektrophoretische Wanderung, Rechromatographie und die Farbreaktionen mit Pauly's Reagens, α -Nitroso-naphthol, Ninhydrin (im Falle von Tyramin) bzw. Silbernitrat und Eisencyanid (bei Dopamin) identifiziert. Die durch Transaminierung bzw. Oxydierung gebildete Säure konnte nicht identifiziert werden. Ihre Eigenschaften waren:

Reaktion mit Pauly's Reagens: orange-rot
Elektrophoretische Wanderung zur Anode (pH 6,8)
Rf-Werte in I 0,86
in VI 0,6
in VIII 0,00-0,05

B. Cuticula-Versuche

Einbauversuche

Um festzustellen, ob eine Substanz für die Cuticula verwendet wird, also eingebaut wird, bekamen Versuchstiere Injektionen der C^{14} -markierten Substanz und wurden nach Verpuppung bzw. Häutung getötet. Die Cuticula der Tiere wurde vom Inneren freipräpariert und die Verteilung der Radioaktivität durch Verbrennungsversuche bestimmt. Die Cuticeln, sowie das restliche Innere, wurden zuerst getrocknet, und jeweils ein Teil zur feuchten Veraschung eingewogen (Methode nach van SLYKE-FOLCH, 88). Das gewonnene $C^{14}O_2$ wurde in NaOH aufgefangen und als Bariumkarbonat gefällt. Siehe auch Abbildung der Verbrennungsapparatur (Abb. 56).

Von jeder Verbrennung wurden 3 $BaCO_3$ -Präparate hergestellt. Die gemessenen Impulse (abzüglich Nullwert) wurden um den Verlust durch Selbstabsorption durch die Schicht korrigiert (Methodik bei 41), und auf mg zur Verbrennung eingewogene Cuticula bzw. Inneres bezogen.

1) Einbau von Tyrosin-Carboxyl- C^{14} in die Cuticula von *Calliphora erythrocephala*.

20 Larven im Alter von 7-8 Tagen bekamen Injektionen von je 10 000 Imp/Min. Tyrosin-Carboxyl- C^{14} . 12 Std. nach Verpuppung wurde die Cuticula von den übrigen Körperbestandteilen getrennt.

Ergebnis: Wiedergefundene Aktivität: etwa 13000 Imp/Min.

Spez. Aktivität der Cuticula: 70,7 Imp/Min. x mg

Spez. Aktivität des Inneren: 73,4 Imp/Min. x mg

bezogen auf Trockengewicht.

Cuticulahydrolysen

Für Aminosäureanalysen und Untersuchung der eingebauten Bestandteile der Cuticula wurden Pupparien von *Calliphora*, Exuvien von *Schistocerca* direkt oder *Schistocerca*cuticeln nach Präparation und Waschen hydrolysiert. Das Waschen bestand in Homogenisieren der sauber präparierten

ticeln in 80 % Methanol, Abzentrifugieren und mehrmaligem Waschen
r festen Bestandteile mit 80 % Methanol.



Abb. 56 Apparatur zur feuchten Veraschung

Die Hydrolysen wurden sauer durchgeführt, mit 6 n HCl, 24 Std. am Rück-
fluß bei 100°C. Das Hydrolysat wurde filtriert über einer Porzellan-
mitte und das Filtrat eingedampft und papierchromatographiert. Auf der
Mitte blieb ein Rückstand, dessen spezifische Aktivität mit einer
Halbquantitativen Methode bestimmt wurde: Eine bestimmte Menge wurde
in Ameisensäure suspendiert und auf kleinen Plättchen angetrocknet, de-
n Radioaktivität dann im Probenwechsler des Zählgeräts FH 49 gemessen
wurde. Der Rückstand wurde dann nochmals unter den gleichen Bedingungen
hydrolysiert, wieder filtriert und die Aktivität des neuen Rückstandes
geprüft.

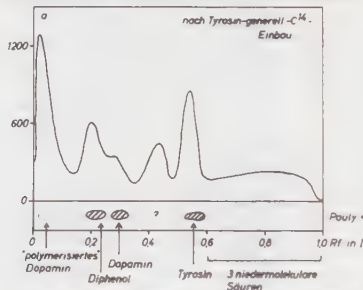
Bei den Hydrolysen bleibt, wie oben erwähnt, ein Rückstand. Bei
Chistocerca-Cuticula betrug seine spezifische Aktivität etwa $3,5 \times 10^{-5}$ pc/mg. Wurde dieser Rückstand nochmals mit 6 n HCl 24 Std. bei
100°C hydrolysiert, wuchs im neu anfallenden Rückstand die spez. Akti-
vität auf etwa $1,3 \times 10^{-4}$ pc/mg.

Bei Calliphora bleibt erheblich mehr hydrolysierbarer Rückstand.

Diese Restaktivität ist wohl Kondensationsprodukten zuzuschreiben, die durch die Hydrolysen immer mehr gereinigt wurden. Der Menge ist wohl keine besondere Bedeutung beizumessen.

Es fiel auf, daß die im folgenden beschriebenen Hydrolyseprodukte vermehrt im 2. Hydrolysat nachweisbar waren.

1) Hydrolyseprodukte aus Cuticeln von Calliphora:



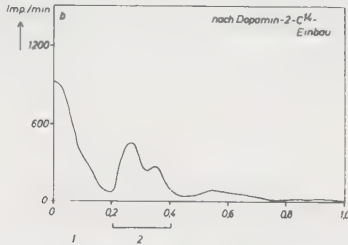
Teil der Abb. 19. Hydrolyse von Calliphora-Cuticeln nach Tyrosin-generell- C^{14} -Einbau

Bei $R_f = 0,5$ liegt Tyrosin, wie durch die Elektrophorese, das UV-Spektrum und vergleichende Papierchromatographie (in I 0,4; in XI 0,8) gezeigt werden konnte. Der Fleck reagierte mit diazotierter Sulfanilsäure. Zwischen $R_f = 0,6$ und 1,0 liegen drei nicht aromatische Säuren; sie koppeln nicht mit Diazoreagens und haben verschiedene Wanderstrecken in der Elektrophorese. Alle drei wandern nicht im System XXII, wodurch schon eine Reihe von Säuren ausgeschlossen ist, z.B. die Säuren des Citratcyclus, die meisten Dicarbonsäuren aliphatischer Kette. Eine der Säuren hatte auch im System XXIV den R_f -Wert 0,0. Die Säuren scheinen stärker polar, wasserlöslicher zu sein. Wahrscheinlich tragen sie mehrere OH-Gruppen.

Die Aktivitätsgipfel nach $R_f = 0,5$ fehlen. Diese stammen also vom Ringgerüst, wie schon oben erwähnt, wenn Dopamin- $2-C^{14}$ eingebaut war (Abb.19).

Unter den Substanzen "2" befindet sich Dopamin (gezeigt durch Elektro-

phorese und Brenzkatechinaminfärbungen) und eine elektroneutrale Verbindung, die ebenfalls mit Eisencyanid, Eisencyanid + Eisensulfat und Diazoareagens färbt.



Teil der Abb. 19. Hydrolyse von Calliphoracuticeln nach Dopamin-2-C¹⁴-Einbau.

Unter 1 verbirgt sich ein Teil Dopamin, der schmierte und in den schlecht chromatographierbaren Resten hängen blieb. Dies wurde gezeigt durch Elektrophorese und Rechromatographie im gleichen System I. Die restliche Aktivität muß wohl von polymerisiertem Dopamin und unhydrolysierten Resten herrühren.

Bei der Hydrolyse bleibt ein Rückstand, der radioaktiv ist. Er enthält wahrscheinlich die sofort nach Hydrolyse wieder reagierenden Chinone als nicht mehr hydrolysierbare Kondensationsprodukte.

2) Identifizierung der aktiven Hydrolyseprodukte aus Cuticeln von Schistocerca nach Tyrosin (gen.-C¹⁴)-Einbau.

Durch physikalische und Methoden der vergleichenden Chromatographie wurde versucht, einige dieser aktiven Hydrolyseprodukte zu identifizieren. Die Hydrolyseprodukte sind zunächst nach ihrem R_f-Wert in I benannt (siehe Abb. 20).

0,00: wahrscheinlich polymeres "Dopamin, da die Hydrolyse nicht unter O₂-Abschluß durchgeführt wurde.

0,15: Diese Substanz verhält sich wie Dopa; die R_f-Werte in System II liegen bei 0,1; die in XI bei 0,2. Sie reagiert mit Eisencyanid und Silbernitrat und wandert nicht im elektrischen Feld bei pH 6,8.

Das Spektrum hat ein Maximum bei 278.

0,18: Nur einmal konnte eine nicht aromatische Säure bei 0,18 entdeckt werden, die in der Elektrophorese relativ weit wanderte. Ein Charakterisierungsversuch durch Rechromatographie in XXIII und XXII mißlang. Die niedermolekularen Säuren müssen vor weiterer Untersuchung gekoppelt werden, da sie flüchtig sein können; so wahrscheinlich hier.



Abb. 57

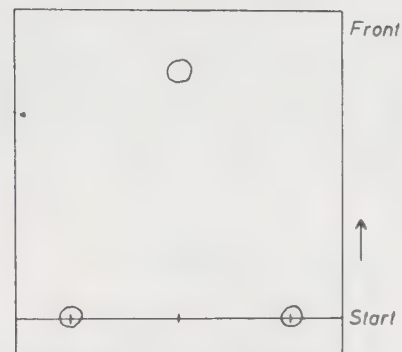
UV-Spektrum der
"0,15"-Substanz

0,3: a) in der Elektrophorese zur Kathode wandernd: Färbungen und Rf-Werte stimmen mit denen von Dopamin überein. Es reagiert mit Pauly's Diazoreagens, Silbernitrat, Eisencyanid, Folin's Phenolreagens, Ninhydrin; die Färbung mit Dinitrophenylhydrazin ist nicht eindeutig genug.

Die Rf-Werte: in I 0,35
in II 0,2-0,25
in XX 0,60
in X 0,90
in XXI 0,5

Die Zeichnung gibt das Verhalten bei Chromatographie auf einer Kieselgeldünnschichtplatte an.

Dem Vergleich "Dopamin" widerspricht nur das UV-Spektrum, das dem Spektrum eines Diphenols mit Ketogruppe in Konjugation zum



"Substanz Q3" Protocatechu-Dopamin
aldehyd

Abb. 58

Dünnschichtchromato-
gramm der "0,3 a -
Substanz".

(Kieselgel G;
Laufmittel: 40 %
Methanol in Essig-
ester)

Ring gleicht. Das Spektrum wurde immer wieder erhalten, nach jeder Chromatographie und Elektrophorese, sowie nach Wechsel des Chromatographierpapiers. Es muß also als sicher gelten.

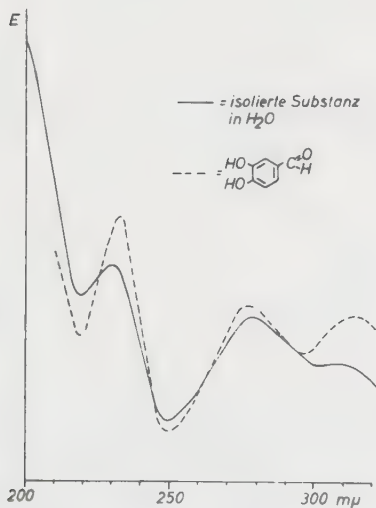


Abb. 59 UV-Spektrum der "0,3a - Substanz"

Die Maxima liegen bei 207, 229, 279, 310 mp.

Die Substanz-Struktur müßte also sowohl den Anforderungen aus dem Dopamin-ähnlichen Verhalten, also auch dem UV-Spektrum genügen. Leider ist es nicht gelungen, das Hydrazon der Substanz zu bilden. Deshalb erscheint es trotzdem noch fraglich, ob eine Ketogruppe vorliegt.

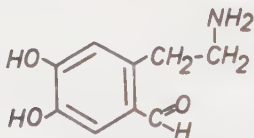


Abb. 60 Mögliche Struktur der "0,3a-Substanz"

b) in der Elektrophorese bei pH 6,8 am Start: Das UV-Spektrum spricht für ein Diphenol. Es ist jedoch nicht gelungen, die geringe Substanzmenge durch Rf-Werte zu identifizieren.

Es hat die folgenden: II 0,1-0,25

IV 0,20

XI 0,75 in XXIV 0,00

Die Rf-Werte stimmen weder mit Tyrosin, noch mit Dopa überein.

Die Diazofärbung ergibt gelborange.

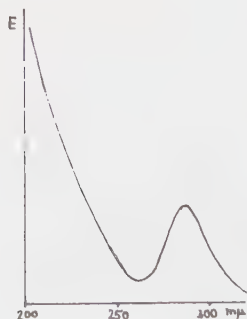


Abb. 61

UV-Spektrum 0,3 b

Aus diesen Daten kann über die Struktur noch nicht viel gesagt werden: Ein Phenol, das weder Tyrosin noch Dopa ist.

0,5: Beim größten Gipfel handelte es sich um Tyrosin. Dies zeigten die Elektrophoresen bei verschiedenen pH-Werten, die Färbungen mit Ninhydrin, Diazoreagens, Nitrosonaphthol. Es reduziert Silbernitrat nicht. Das UV-Spektrum ist gut vergleichbar. Alle Rf-Werte stimmen mit denen von Tyrosin überein, nämlich

- in I 0,40 (Der erste Rf-Wert ist durch HCl verändert)
- in IV 0,31
- in XII 0,00-0,3 (Schwanz)
- in XI 0,80

0,60: ist elektro-neutral, reagiert spontan mit Folin's Reagens und Nitrosonaphthol, Silbernitrat wird nicht reduziert. Das UV-Maximum liegt bei 279 mμ, der Rf-Wert in XI entspricht mit 0,8-0,95 etwa Tyrosin. Die Identität mit Tyrosin ist aber durch die eindeutig verschiedenen Radioaktivitätsspitzen in I etwas in Frage gestellt. Jedoch kennt man solche Effekte, wenn HCl nicht vollständig entfernt war vor der Chromatographie. In Spuren liegt bei 0,60 noch eine Diphenolcarbonsäure, die deutlich verschieden ist von der Säure bei 0,7.

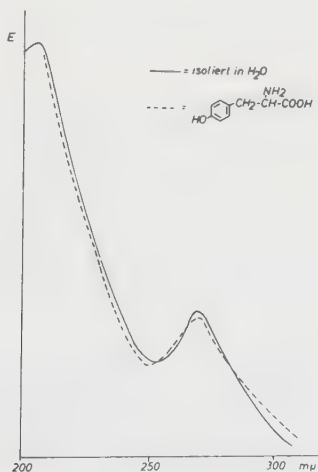


Abb. 62

UV-Spektren von
"0,5-Substanz"
und Tyrosin

Reaktionen mit Folin, Diazoreagens, AgNO_3 ; dissoziiert stärker als die Säure bei 0,7.

0,70: a) negativ geladen bei pH 7,0. Die Säure erwies sich durch alle untersuchten Eigenschaften als Dihydroxyphenylbrenztraubensäure.

Sie hat die Rf-Werte:

0,05 in VI; 0,00 in VII; 0,05-0,15 in VIII. Mit Silbernitrat entsteht vor Schwarz zuerst eine gelbliche Färbung. Deutlich und spontan reagiert die Säure mit Folin's Reagens und Dinitrophenylhydrazin. Das Spektrum der Säure ist dem von 3,4-Dihydroxyphenylbrenztraubensäure identisch.

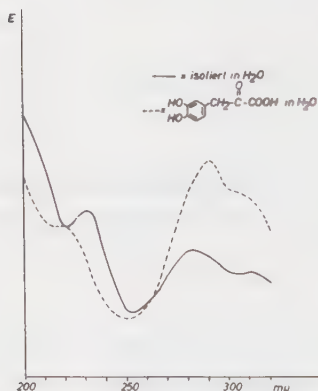


Abb. 63

UV-Spektren von
"0,70a-Substanz"
und 3,4-Di-
hydroxybrenz-
traubensäure

b) positiv geladen (Elektrophorese bei pH 6,8): Es scheint eine kleine Menge Tyramin vorzuliegen, was wahrscheinlich gemacht wurde durch den Rf-Wert in I (0,75), die Elektrophorese und die Färbungen (Folin +, AgNO_3 -).

0,8-

0,95: wandert nicht in der Elektrophorese bei pH 6,8; reagiert mit diazotierter Sulfanilsäure, jedoch nicht mit AgNO_3 . Das UV-Spektrum hat ein Maximum bei 255 mμ. Die Substanz wurde nicht weiter untersucht. Es handelt sich wohl um ein Monophenol. p-Stellung ist wegen der Herkunft aus Tyrosin wahrscheinlich. Das UV-Spektrum würde durch eine

benachbarte Carbonylfunktion erklärt.



Abb. 64

UV-Spektrum der
"0,8-0,95-Substanz"

C. Ein Vergleich zwischen der Wildform von Schistocerca und einer Albinomutante

Bei der chromatographischen Auftrennung der Tyrosin-metaboliten aus wilden und Albino-Heuschrecken konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Für die in Abb. 13 aufgezeichneten Umwandlungsbilder der Wildform lassen sich ganz entsprechende aus Albinohomogenaten einsetzen.

Zum radioautographischen Vergleich radioaktiver Cuticula wurden kleine, gleichmäßig dicke Stückchen von Bein-cuticeln oder Flügeln auf Objektträger gelegt und mit Stärkelösung überdeckt. Kodak-Spezialfilm für Radioautographie wurde in der Dunkelkammer über das Objekt gebreitet und in einer lichtdichten Kasette 3-6 Wochen exponiert, dann entwickelt. Es ergaben sich keine bemerkenswerten Unterschiede in Lokalisation und eingebauter Menge radioaktiven Materials zwischen den beiden Mutanten.

Inkubationen mit Tryptophan wurden analog den Inkubationen S. 95 durchgeführt und ausgewertet.

Teil II: Höhere Organismen

Das angesäuerte Volumen Harn oder wässriger Extrakt wird durch Rotationsverdampfen eingengt und tiefgeköhlt. Ausgefallene Salze werden abzentrifugiert und die Lösung mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft: Äther-Extrakt. Die wässrige Phase enthält die phenolischen Amine, Glykoside, Säureamide und Methoxyverbindungen. Sie wird über eine Aluminiumoxyd-Säule chromatographiert (200 g neutrales Aluminiumoxyd Woelm/Liter Ausgangsmaterial, geringste Aktivitätsstufe). Zur Elution werden 300 bis 400 ml 0,5 M HCOOH gebraucht, anschließend meist noch 50 ml 20 % HCOOH . Aus dem Eluat werden die Acetylämine in Essigsäureäthylester geschüttelt (der Verteilungskoeffizient für N-Acetyl-dopamin wurde zu 1 bestimmt). Der nach Verdampfen des Essigesters verbleibende Rückstand wird im System I papierchromatographiert.

1) Normaler menschlicher Harn

Größere Mengen, 4-5 Liter, wurden eingengt im Rotationsverdampfer und behandelt nach obiger Methodik. Es wurde versucht, auf einem Chromatogramm eine möglichst hohe Konzentration von Metaboliten zu erhalten. Auf den Chromatogrammen im Anschluß an die Säulenchromatographie konnten nur folgende Diphenole mit Silbernitrat lokalisiert werden:

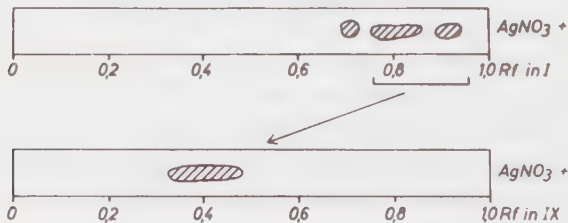


Abb. 67 Schema der Chromatogramme zu Kapitel 1)

Der Rf-Wert in IX stimmte mit dem von N-Acetyl-dopamin überein. N-Acetyl-dopamin wurde aber durch Hydrolyse ausgeschlossen.

Die Ätherphase enthielt in großer Zahl Monophenole.

2) Versuche mit Rinder-Nebennieren

Das frische Gewebe wurde von Fett befreit und in 10 ml eiskaltem 80 % Methanol/g Gewebe homogenisiert und zentrifugiert. Nach Ansäuerung wurde das Methanol eingedampft und ausgeäthert. Die wässrige Phase wurde nach obigem Schema behandelt. Im dritten Versuch wurde statt Methanol 5 % Trichloressigsäure verwendet. Die Ausbeute an Catecholaminen war jedoch schlechter.

Auf den ein- und zweidimensionalen Papierchromatogrammen ließen sich die freien Amine mit Diazoreagens entdecken. Daneben ließ sich ein Aromat mit dem Rf-Wert der Acetylverbindungen (0,85) lokalisieren. Die weitere Untersuchung ergab folgende Eigenschaften:

Rf-Werte	Färbungen	Elektrophorese
I 0,9-0,95	AgNO ₃ +	bei pH 6,8 keine Wanderung
X 1,0	Diazoreagens rostbraun	
IX 0,8-0,9	Dinitrophenylhydrazin +	

Beim Versuch der Chlorierung ließ sich keine C-N-Bindung nachweisen. Das UV-Spektrum zeigte Ähnlichkeit mit dem des Protocatechualdehyd. Es ließ sich auch das Dinitrophenylhydrazon bilden. Und durch Dünnschichtchromatographie mit dem entsprechenden Hydrason des Protocatechualdehyds vergleichen.

Diese Hinweise sprechen für eine aromatische Verbindung mit 2 OH-gruppen in o-Stellung. Eine Keto- oder Carbonylfunktion liegt in der Seitenkette, das Molekül trägt bei pH 6,8 keine Ladung. Wegen der Biogenese aus dem Brenzcatechinamin könnte man vermuten, daß hier Dihydroxyphenylacetaldehyd- α -ol vorliegt, entstanden aus Noradrenalin durch Aminoxydation. Die Carbonylfunktion wäre nicht am Ring konjugiert und die UV-Absorption bei 310 m μ geschwächt. Der geringere Rf-Wert des Hydrazons auf der Dünnschichtplatte spricht auch für eine weitere polare Gruppe.

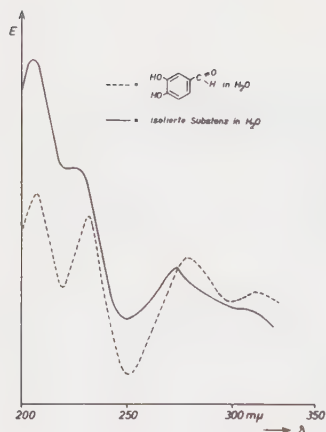


Abb. 65

UV-Spektrum des Aldehyds
im Vergleich mit Protocatechualdehyd

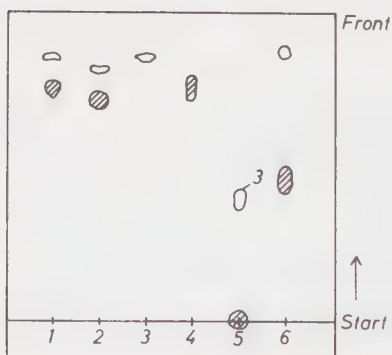


Abb. 66

Dünnschichtchromatogramm
verschiedener Hydrazone

3) Hemmung der Monoaminoxidase

Versuche mit Mäusen:

30 weiße und 10 graue Mäuse bekamen Injektionen von Iproniazid (Marsilid-Hoffmann La Roche) in wässriger Suspension, die gut vertragen wurden. Die Dosis betrug 100 mg/kg.

Der Urin wurde über 12 Std. gesammelt (50 ml) und aufgearbeitet. Die Tie-

re wurden getötet, seziiert und die Organe in eisgekühlten Bechergläsern gesammelt: Gehirn, Leber + Milz, Nebennieren, Herz, Nieren. Die gleichartigen Organe aller Versuchstiere wurden jeweils in 80 % Methanol homogenisiert, zentrifugiert und angesäuert. Das Methanol wurde abgedampft, der wässrige Extrakt ausgeäthert und jeweils dem obigen Aufarbeitungsweg unterworfen.

Lediglich im Nebennieren-Extrakt konnten zwei Flecke mit dem Rf-Wert der Brenzkatechinamine lokalisiert werden.

Versuche mit menschlichem Harn:

Von 3 jüngeren Patienten, die erst seit kurzem INH-behandelt worden waren (ohne PAS, p-Aminosalicylsäure, ohne Vitamin B₆), also noch nicht an den Hemmstoff adaptiert hatten, wurden 12 l Urin gesammelt. Nach Einengen wurde mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt, die organische Phase rotationsverdampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen, bei pH 7,5 über Al₂O₃ chromatographiert. Das Eluat wurde papierchromatographisch untersucht. Unter den diazopositiven Substanzen war keine mit dem Rf-Wert des N-Acetyl-dopamin.

4) Der Nachweis von N-Acetyl-dopamin und anderer neuer Dopaminmetaboliten im Harn beim malignen Phäochromoblastom

Zur Krankengeschichte des Patienten siehe Seite 40! Der gesammelte Harn des Patienten (insgesamt 4 l) wurde mit einigen ml konz. HCl angesäuert. Das Volumen wurde im Rotationsverdampfer auf etwa 1/4 eingeengt, gekühlt, klarzentrifugiert und dreimal mit gleichem Volumen Äther extrahiert. Weiterer Weg siehe Schema S. 44!

Ätherlösliche Anteile:

Die Ätherlösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Zurück blieben gelbliche Kristalle, deren Infrarot-Spektrum noch auf ein Gemisch schließen ließ. Die Papierelektrophorese zeigte, daß darunter geringe Mengen monophenolischer Säuren (Silbernitrat negativ), aber keine Diphenolcarbonsäuren waren, wie eigentlich zu erwarten war. Zur Auftren-

nung des Gemisches wurde eine Papierchromatographie auf Macherey-Nagel-2214FF-Papier im System V angeschlossen. Die Färbung mit Silbernitrat ergab folgendes Bild:

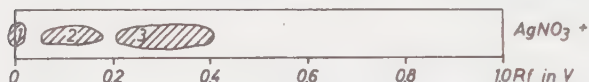


Abb. 68 Chromatogramm der ätherlöslichen Anteile

- 1: ergab nach Eluieren 4 mg, ließ sich aber nicht kristallisieren.
- 2: Starke Absorption unter der UV-Lampe. Nach Eluieren und Umkristallisieren blieben 10 mg weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 133-134°C. Es wurde versucht, aus dem unreinen Rest von 3 mg das Acetat der Verbindung herzustellen, dessen IR-Spektrum keine weiteren Schlüsse erlaubte.

Durch Dünnschichtchromatographie wurde Trihydroxybenzol als nicht identisch ausgeschlossen. Das unbekannte Diphenol erwies sich dabei als einheitlich.

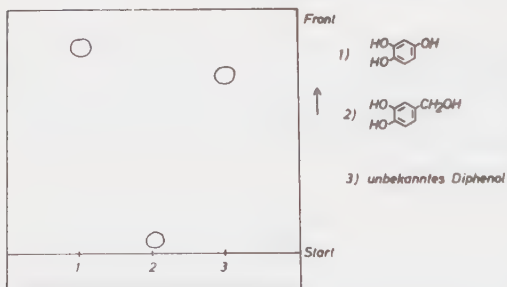


Abb. 69

Vergleichende Dünnschichtchromatographie des unbekannten Diphenols

Löslichkeit: gut in Methanol, Aceton, Essigester, Pyridin,
in Benzonitril nach leichtem Erwärmen,
sehr schlecht in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol.

Koppelung mit diazotierter Sulfanilsäure orangerot.

Für 3-4-Dihydroxybenzylalkohol spricht die C-H-Analyse, wenn nach folgender Berechnung vorgegangen wird:

Gefunden:

C = 60,1 %

H = 6,65%

N = 1,6 %

N entspricht Resten von Pyridin aus der KMR-Messung. Zieht man die entsprechenden Werte für C und H ab, können folgende gefundenen Werte den theoretischen gegenübergestellt werden:

Gefunden:

C = 60,8 %

H = 6,32 %

N = 0 %

O = 32,8 %

theoretisch:

56,2 %

6,25 %

0 %

37,5 %

Dabei ist vorausgesetzt, daß außer O keine Fremdatome enthalten sind.

Wasserlösliche Anteile:

Das Eluat aus der Al_2O_3 -Säule wurde mit Essigester extrahiert, der Rückstand aus dem Extrakt in I chromatographiert und mit Silbernitrat entwickelt. Siehe Schema!

Der Fleck bei 0,7 ist wahrscheinlich identisch mit einer Substanz, die auch bei anderen Autoren beschrieben ist. Die Struktur ist noch unbekannt.

Bei Rf-Wert 0,35 und 0,4 lagen die Brenzkatechinamine. Im Rechromatogramm in System III und IV trennte sich eine Substanz ab, die die Brenzkatechinaminfärbungen mit Eisencyanid und Eisen(III)Sulfat gab, aber keines der drei bekannten war. Die Rf-Werte: in III 0,04
in IV 0,84

Es könnte noch an 3-O-Methyladrenalin gedacht werden, dessen Rf-Werte noch nicht bekannt waren.

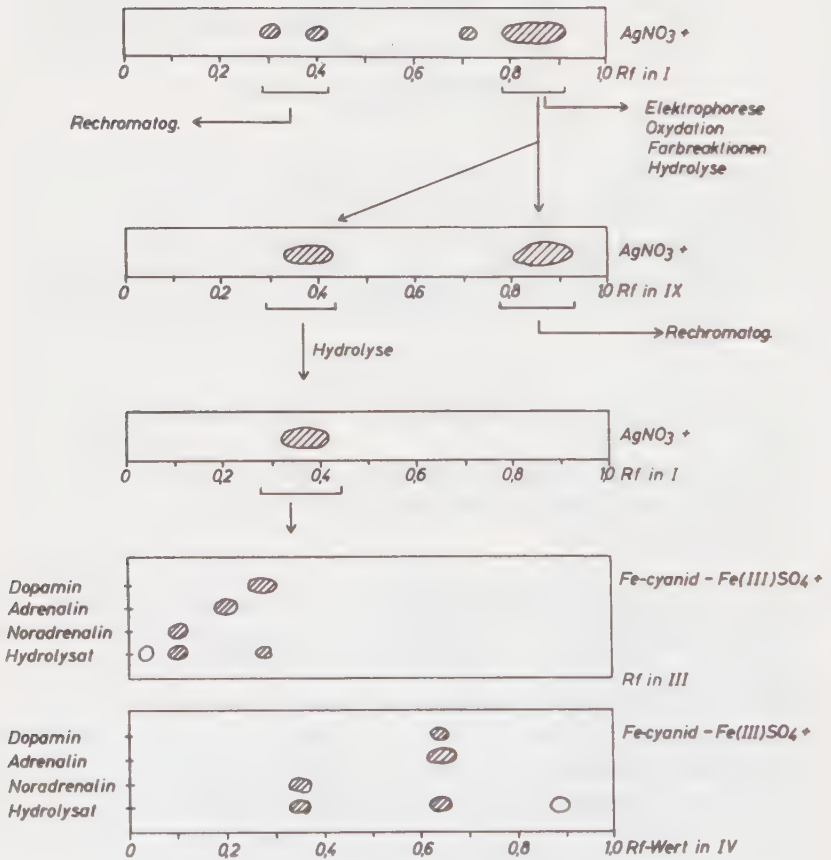


Abb. 70 Schema zur chromatographischen Auftrennung

Die Identifizierung des Gemisches bei $R_f = 0,85$ ist im Schema dargestellt. Das Gemisch fluoreszierte unter der UV-Lampe, keine der Komponenten wanderte in der Elektrophorese bei pH 6,8. Oxydationsversuche mit saurem Kaliumpermanganat nach Acetylierung änderten nichts an der elektrophoretischen Wanderung. Im System I wanderte das Gemisch gemeinsam nach $R_f = 0,7-0,95$. Keine der Komponenten reagierte mit Dinitrophenylhydrazin. Das UV-Spektrum des Gemisches hatte eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von N-Acetyl-dopamin; eine erste Hydrolyse ergab auch Dopamin.

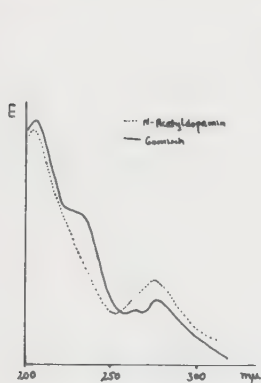


Abb.71 UV-Spektrum des Gemisches "0,85".

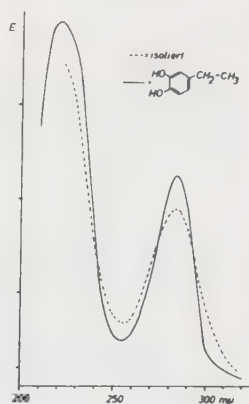


Abb.72 UV-Spektrum der Komponente mit dem R_f -Wert 0,85-0,9 in IX im Vergleich mit 3,4-Dihydroxyphenyläthan.

In System IX gelang die Auftrennung:

Die Komponente mit dem R_f -Wert 0,85-0,9 hatte mit einem Absorptionsmaximum bei 281 mμ das Spektrum eines Diphenols, sie reduzierte Silbernitrat sehr stark, färbte mit Diazoreagens orangerot, sowie mit Folin's Phenolreagens, jedoch nicht mit Dinitrophenylhydrazin. Sie widersteht Oxydationsversuchen und verhält sich bei pH 6,8 elektrisch neutral. Sie ist nicht hydrolysisierbar.

Wie bei den Ergebnissen berichtet, stimmen die R_f -Werte in 6 Systemen mit denen von Dihydroxyphenyläthan (Äthyl-brenzkatechin) überein. In

einer Dünnschichtchromatographie verhielt sich die isolierte Substanz wie die Zeichnung wiedergibt:

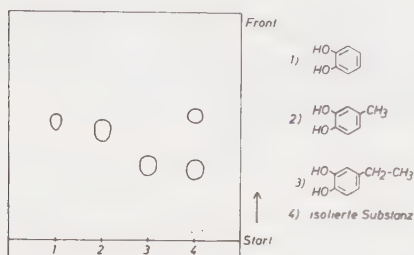


Abb. 73 Dünnschichtchromatogramm des isolierten "Dihydroxyphenyläthans".
Kieselgel G; Laufmittel: 15 % Methanol in Benzol.

Die beiden anderen Komponenten wurden als N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin identifiziert (siehe auch Schema der Beweisführung, Abb.70!). Nach Hydrolyse der Substanzen ließ sich im Hydrolysat Dopamin und Noradrenalin nachweisen.

Einige Fälle von gutartigem Phäochromocytom

Urin wurde gesammelt und wie beschrieben aufgearbeitet. Zwei Chromatogramme wurden hergestellt: in I und IX. Trat bei $R_f = 0,4$ in IX kein Silbernitrat reduzierender Fleck auf (R_f -Wert von N-Acetyl-dopamin!), wurde nicht weiter untersucht.

a) Patientin, die seit mehreren Jahren typische Blutdruckkrisen hatte.

In der Ätherphase des Urins wurden nur phenolische Säuren gefunden, die Silbernitrat nicht reduzierten. An neutralen und basischen Diphenolen erschien auf dem Chromatogramm des Säurenulats:

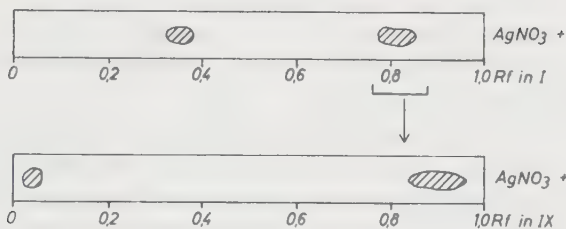


Abb. 74 Schema zur Aufarbeitung a

Auf dem Rechromatogramm in IX wurden zwei Substanzen entdeckt; beide koppelten Diazoreagens orange, reduzierten Silbernitrat und hatten keine NH₂-Gruppen (Ninhydrin). Der Fleck bei 0,9 reagierte eindeutig zu einem Dinitrophenylhydrazon.

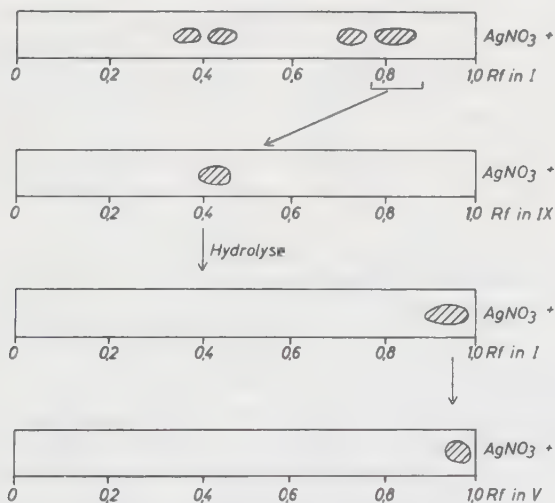


Abb. 75 Schema zur Aufarbeitung b

- b) Urin mit 161 μg Adrenalin und 1397 μg Noradrenalin im 24-Std.-Volumen von 760 ml.

Aus der Säule wurden durch HCOOH 4 Substanzen eluiert:

Bei 0, 35 und 0,45 liegen die Brenzkatechinamine, die Flecke absorbierten auch im UV-Auflicht.

Der Fleck bei 0,8 absorbierte ebenfalls unter der UV-Lampe. Sein R_f -Wert in IX lag bei 0,4. Nach Hydrolyse bei Rechromatographie in I wanderte der AgNO_3 -positive Fleck nach $R_f = 0,9$. Er wanderte auch in der Elektrophorese und hatte im System V den R_f -Wert 0,95 gemeinsam mit Protocatechusäure. Leider war eine Elektrophorese vor der Hydrolyse nicht durchgeführt worden. Trotzdem ist es wahrscheinlich, daß der Ester einer Dihydroxysäure, vielleicht der Protocatechusäure vorlag. Dafür spricht der verminderte R_f -Wert in I, der R_f -Wert in IX und die Tatsache, daß die Substanz nicht mit Äther extrahierbar war.

- g) Dieser Patient schied 277 μg Adrenalin und 3104 μg Noradrenalin im 24-Std.-Volumen von 740 ml aus.

Die neutrale Fraktion zeigte 3 AgNO_3 -positive Flecke:

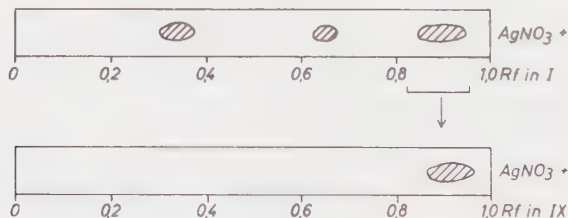
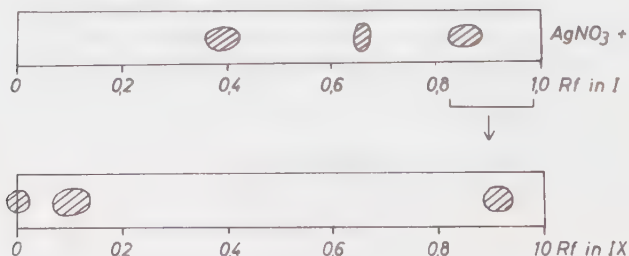


Abb. 76 Schema zur Aufarbeitung g

- h) Harn mit 175 $\mu\text{g}/24$ Std. Adrenalin und 95 $\mu\text{g}/24$ Std. Noradrenalin bei einem 24-Std.-Vol. von 1390 ml.



0,3 und 0,85 absorbierten unter der UV-Lampe. In IX trennte die Substanz 0,85 in 2 Flecke.

h); g)

Bei 2 Patienten, bei denen das Phäochromocytom sowohl klinisch eindeutig als auch durch die Operation bestätigt wurde, konnten mit der hier angewendeten Methode nur Catecholamine im Harn gefunden werden; keine weiteren Stoffwechselprodukte.

Der eine hatte eine Ausscheidung von $173 \mu\text{g}$ /12 Std. Noradrenalin und $41,0 \mu\text{g}$ Adrenalin, der andere $545 \mu\text{g}$ Adrenalin und $970 \mu\text{g}$ Noradrenalin.

5) Pharmakologische Versuche

Herzmuskelversuche wurden an Papillarmuskeln durchgeführt, die den rechten Ventrikeln von 300 bis 350 g schweren Meerschweinchen entnommen waren. Der Durchmesser der Muskeln war kleiner als 1 mm, ihre Länge im ungedehnten Zustand ca. 3 bis 4 mm. Sie wurden mit Rechteckimpulsen von 1 msec Dauer gereizt. Die Intensität wurde etwas oberhalb der Reizschwelle bei 2 bis 5 Volt eingestellt. Als Suspensionsmedium wurde Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, die etwas modifiziert war. Durchgast wurde mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 . Temperatur 35°C . Die isometrischen Kontraktionen wurden bei einer Grundspannung von 400 mg optisch registriert. Die Muskeln kontrahierten sich zunächst etwa eine Stunde, bis die Kontraktionskraft annähernd gleich blieb.

Für diese Versuche wurde zum ersten Mal N-Acetyl-noradrenalin synthetisiert. (Acetylamino-3,4-dioxyphenyl-carbino) Die Synthese wurde in Anlehnung an diejenige von N-Acetyl-dopamin ausgearbeitet.

Zum Test an isolierten Samenblasen ⁺⁾ von Meerschweinchen wurde eine automatische Apparatur von W. FELIX (24) verwandt. Die Muskeln wurden zugeschnitten zu gleicher Größe und in üblicher Weise in Ringerlösung auf-

⁺⁾ Samenblasen sind in der Hauptsache zur Prüfung sympathicolytischer Wirkung herangezogen. Ihre Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin ist nicht ganz so hoch wie die anderer Organe (12).

gehängt. Die Kontraktionen wurden durch einen auf berußer Trommel aufliegenden Zeiger aufgezeichnet. 6 Kontrollgaben Adrenalin wurden zuerst eingespritzt, um zu prüfen, ob die Empfindlichkeit konstant blieb.

Wie auf Seite 51 ausgeführt, sind N-Acetyl-dopamin und N-Acetyl-noradrenalin pharmakologisch wenig wirksam.

Teil III: Über das Vorkommen der Aminacetylase bei Insekten
und Säugetieren

Die Gewebe wurden homogenisiert in eiskaltem Phosphatpuffer (m/100, pH 7,2) und 3 Min. bei 150 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand diente als Enzympräparat.

Die Reaktion benötigte als Cofaktor Coenzym A, das zuerst in einer ersten Inkubation in Acetyl-CoA umgewandelt werden mußte. Dazu wurde ein Extrakt aus *Clostridium kluyveri* verwandt (siehe Auch S. 74).

100 mg Kluyveripulver (getrocknete Zellen nach 91)⁺ wurden in 1 ml m/100 Phosphatpuffer pH 7,2 1 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert.

Inkubationsansatz I:

- 0,05 ml dieser Aufschwemmung
- 0,1 ml Trispuffer (0,01 m, pH 8,0)
- 0,03 ml m/20 Acetyldilithiumphosphat⁺
- 0,1 ml 0,1 m Cystein
- 0,1 ml $3,3 \times 10^{-4}$ m CoA

Nach 10-20 Min. Inkubation bei 28°C:

Inkubationsansatz II:

- Gesamtansatz I
- 1 mg Tyramin
- 1 ml Phosphatpuffer 7,2 (m/100)
- 0,03 µc Tyramin-2-C¹⁴
- 1 ml Enzympräparat

Inkubationsdauer 2 Std. bei 37°C in O₂-Atmosphäre. Zum Kontrollansatz wurde statt 1 ml Enzympräparat 1 ml Phosphatpuffer gegeben.

Zur getrennten Inkubation von Kernen und Mitochondrien wurden Gewebe in 0,25 m Sucrose homogenisiert, durch Mull filtriert und bei 150 U/Min. zentrifugiert. Der Rückstand wurde in Phosphatpuffer aufgeschwemmt und diente als Kernpräparat, der Überstand wurde nochmals zentrifugiert bei 6600 g 20 Min. Der Rückstand wurde ebenfalls aufgeschwemmt und diente als Mitochondrienpräparat. Der Überstand wurde als Präparat löslicher

⁺) hergestellt im Max-Planck-Institut für Zellochemie

Enzym verwendet.

Die Umwandlungsprodukte aus der Inkubation wurden chromatographisch aufgetrennt und ausgewertet, wie schon auf S. 95 beschrieben.

Zum Vergleich der Ergebnisse werden folgende Angaben über die Enzymkonzentration benötigt (Abhängigkeit der Umwandlung von der Enzym- und Substratkonzentration siehe auch Lit.Nr. 42!): Zur Homogenisation wurden eingewogen bei Versuch (siehe Tab. VIII; S.59)

- | | |
|-------|--|
| Nr. 1 | 5 g Calliphoralarven/10 ml Puffer |
| Nr. 2 | 8 g Calliphoralarven/10 ml Puffer |
| Nr. 3 | etwa 2 g Schistocerca = 1 Imago/10 ml Puffer |
| Nr. 4 | etwa 1 g ^{Tabris} larven/10 ml Puffer |
| Nr. 5 | 1 g Calliphoralarven/10 ml Puffer |
| | 1 g Calliphorapuppen/10 ml Puffer |
| | 10 Stück Drosophilalarven + Puppen/ml Puffer |
| | 10 Stück Drosophilafliegen/ml Puffer |
| Nr. 6 | 1 g Calliphoralarven/10 ml Puffer |

Bei allen Säugetiergeweben wurden 10 g/10 ml Puffer eingewogen.

Die Acetylierungsraten verschiedener Insekten können ^{hier} annähernd miteinander verglichen werden, da der Anteil an enzymatisch inaktiver Cuticula verschieden groß ist.

Literaturverzeichnis

1. Adams, B.; M. Harfenist;
S. Loewe "New Analogs of Tetrahydrocannabinol"
J.Am.Chem.Soc. 71 (1949), 1624
2. Armstrong, M.D.; K.N.F. Shaw;
A. McMillan "3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid,
a urinary metabolite of norepinephrine"
Biochim.biophysica Acta 25 (1957), 422
3. Avery, T.; C.M. McLeod; M.McCarty J.Exper.Med. 79 (1944), 137
4. Axelrod, J. "Effect of drugs on the metaboliten of
catecholamines" in "Adrenergic mechanisms",
Ciba Found.Symp. 1960, 37
5. Axelrod, J.; I.J. Kopin; J.D.Mann "3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol Sulfate,
a new metabolite of epinephrine and nor-
epinephrine"
Biochim.biophysica Acta 36 (1959), 576
6. Axelrod, J.; R. Tomchick "Enzymatic O-Methylation of Epinephrine
and other Catechols"
J.biol.Chemistry 233 (1958), 702
7. Becker, E.; E. Plagge "Über das die Pupariumbildung auslösende
Hormon der Fliegen"
Biol.Zbl. 59 (1939), 326
8. Bergold, G. "Eine Mikroinjektionsspritze und Mikro-
bürette bis zu 0,1 cmm"
Biol.Zbl. 61 (1941), 158
9. Bloch, K. Physiol.Rev. 27 (1947), 574
zitiert in DECKER (21)
10. Brachet, J.; A.E. Mirsky "the Cell", V, Academic Press 1961, 514
11. Brodie, B.B.; J. Axelrod J. Pharmacol. 94 (1948), 29
12. Brügger, J. "Die isolierte Samenblase des Meerschwein-
chens als biologisches Testobjekt zur
quantitativen Differenzierung der sympa-
thikolytischen Wirkung der genuinen Mut-
terkornalkaloide und ihrer Dihydroderivate"
Dissert. Basel 1945

13. Butenandt, A.; W. Weidel;
E. Becker
"Kynurenin als Augenpigmentbildung auslösendes Agens bei Insekten"
Naturwissenschaften 28 (1940), 63
- Butenandt, A.; W. Weidel;
H. Schlossberger
"3-Oxy-kynurenin als ent-Gen-abhängiges Glied im intermediären Tryptophan-Stoffwechsel" Z.Naturforsch.4b (1949), 242
- Butenandt, A.;
"Über die Biochemische Analyse einer Gen-Wirkkette der Pigmentbildung bei Insekten" Antrittsvortrag vor der Tisza Istvan Ges. d.Wiss., 28. Sept. 1942
14. Butenandt, A.; U. Gröschel;
P. Karlson; W. Zillig
"Über N-Acetyl-tyramin, seine Isolierung aus Bombyx-Puppen und seine chemischen und biologischen Eigenschaften"
Arch.Biochem.Biophys. 83 (1959), 76
15. Butenandt, A.; P. Karlson
"Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristalliner Form"
Z.Naturforschung 9b (1954), 389
16. Chou, T.C.; M. Soodak
"The acetylation of D-Glucosamine by pigeon liver extracts"
J.biol.Chemistry 196 (1952), 105
17. Clever, U.; P. Karlson
"Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus Tentans durch Ecdyson"
Exptl.Cell Res. 20 (1960), 623
18. Daly, J.W.; B. Witkop
"Neuere Untersuchungen über zentral wirkende endogene Amine"
Angew.Chemie 75 (1963), 552
19. Dannenberg, H.
"Zum Wirkungsmechanismus krebserzeugender Faktoren" Dtsch.Med.Wschr.88 (1963), 605
20. Debuch, H.
"Über die Fettsäuren aus grünen Blättern und das Vorkommen der ³-trans-Hexadecensäure" Z.Naturforschung 16b (1961), 561
21. Decker, K.
"Die aktivierte Essigsäure", Stuttgart 1959
22. Dirscherl, W.; W. Schmidtmann
"Isolierung von Vanillinsäure aus menschlichem Harn"
Naturwissenschaften 46 (1959), 329

23. Fearon, W.R. "The Detection and Estimation of Uric Acid by 2:6-Dichloroquinone-chloroimide" Biochem.J. 38 (1944), 399
24. Felix, W. zitiert bei SCHLEMMER, pharmazeut.Ztg. 107 (1962), 1301
25. Gierer, A.; G. Schramm "Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus" Z.Naturforschung 11b (1956), 138
26. Gilmour, D. "Biochemistry of Insects", Academic Press 1961
27. Goldenberg, M.; M. Faber; E.J. Alston; E.C. Chargaff "Evidence for the Occurrence of Nor-Epinephrine in the Adrenal Medulla" Science 109 (1949), 534
28. Goldstein, F.B. "Studies on phenylketonuria II: The excretion of N-acetyl-L-phenylalanine in phenylketonuria" Biochim.biophysica Acta 71 (1963), 204
29. Goldstein, M.; S.B. Gertner "Formation of a New Metabolite of Epinephrine and Norepinephrine in Liver and Kidney" Nature 187 (1960), 147
30. Goldstein, M.; J.M. Musacchio "The formation in vivo of N-acetyldopamine and N-acetyl-3-methoxydopamine" Biochim.biophysica Acta 58 (1962), 607
31. Goodman, L.S.; A. Gilman "The Pharmacological Basis of Therapeutics" The Mcmillan Comp. 1956
32. Graßmann, W.; K. Hannig; M. Schleyer "Zur Aminosäure-Sequenz des Kollagens II" Z.physiol.Chemie 322, (1960), 71
33. Graßmann, W.; H. Endres; M. Oppelt; H. ElSissi "Affinität von Gerbstoffen und Gerbstoff-ähnlichen Substanzen zur CO-NH-Gruppierung in Polyamiden" Das Leder 10 (1959), 149
34. Gerngross, O.; K. Voss; H. Herfeld "Über eine hochempfindliche, streng tyrosin-spezifische Farbreaktion auf para-substituierte Phenole. Der Tyrosingehalt verschiedener Proteine, insbesondere von Kollagen und Gelatine" Ber.66 (1933), 435

35. Hannig, K. Clin.chim.Acta 4 (1959), 51
36. Hunter-Jones, P. "An Albino Strain of the Desert Locust" Nature 180 (1957), 236
37. Hunter-Jones, P. "Rearing and Breeding Locusts in the Laboratory", London 1961
38. James, W.O. "Demonstration and Separation of Nor-adrenaline, Adrenaline and Methyladrenaline" Nature 161 (1948), 851
39. Johnson; Hodge J.Am.Chem.Soc. 35 (1913), 1023; zitiert nach HEILSTEIN's Handbuch der org.Chemie, Springer 1918-1954
40. Jores Handbuch der Inneren Medizin, VII, Teil 1, 284
41. Karlson, P. unveröffentlicht
42. Karlson, P.; H. Ammon "Biogenese und Schicksal der Acetylgruppe des N-Acetyl-dopamins" Z.physiol.Chem. 330 (1963), 161
43. Karlson, P.; U. Liebau in Vorbereitung
44. Karlson, P.; G. Peters in Vorbereitung
45. Karlson, P.; I. Schlossberger-Raecke "Die Sklerotisierung der Cuticula bei der Wildform und der Albinomutante von Schistocerca gregaria Forsk." J.Ins.Physiol. Vol.8 (1962), 441
46. Karlson, P.; C.E. Sekeris "Biochemistry of Insect Metamorphosis" Comparative Biochemistry VI(A), 36 (1963)
47. Karlson, P.; C.E. Sekeris "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten IX: Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels durch Ecdyson" Biochim.biophysica Acta 63 (1962), 489
48. Karlson, P.; C.E. Sekeris "N-Acetyl-dopamine as Sclerotizing Agent of the Insect Cuticle" Nature 195 (1962), 183
49. Karlson, P.; C.E. Sekeris; K.E. Sekeri "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VI: Identifizierung von N-Acetyl-3,4-dihydroxy- β -phenäthylamin (N-Acetyl-dopamin) als Tyrosinmetabolit" Z.physiol.Chemie 327 (1962), 86

50. Karlson, P. "New Concepts on the Mode of Action of Hormones" Perspectives in Biology and Medicine, Vol. VI, 2 (1963), 203
51. Karlson, P. "On the Chemistry and Mode of Action of Insect Hormones" General and Comparative Endocrinology, Academic Press 1962, Suppl.1;1
52. Kirshner, C.; C. McGoodal; L. Rosen "Metabolism of dl-Adrenaline-2-C¹⁴ in the Human" Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 98 (1958), 627 unveröffentlicht
53. Klenk, E.; H.J. Tomuschat "3,4-Dihydroxyphenylglycol, a new metabolite of Epinephrine" Arch.Biochem.biophysica 89 (1960), 148
54. Kopin, I.J.; J. Axelrod "Technique for the Study of Alternate Metabolic Pathways; Epinephrine Metabolism in Man" Science 131 (1960), 1372
55. Kopin, I.J. "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid" The Harvey Lectures 1957/58, Academic Press 1959, 83
56. Kornberg, A. "Structure of Melatonin" J.Am.Chem.Soc. 81 (1959), 6084
57. Lerner, A.B.; I.D. Case; R.V. Heinzelman "Isolation of Melatonin and 5-Methoxy-indole-3-acetic acid from bovine Pineal glands" J.biol.Chemistry 235 (1960), 1992
58. Lerner, A.B.; J.D. Case; Y. Takahashi J.Exptl.Zool. 135 (1957), 19; 136 (1958), 595; zitiert in GILMOUR (26)
59. Limpel, L.E.; J.E. Casida "Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts" J.biol.Chemistry 160 (1945), 173
60. Lipmann, F. "Zum biologischen Abbau der Essigsäure VI: "Aktivierte Essigsäure", ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur" Liebigs Ann. 574 (1951), 1
61. Lynen, F.; E. Reichert; L.Rueff "Sclerotization and Melanization - Two independent processes in the cuticle of the Desert Locust" Nature 180 (1957), 237
62. Malek, S.R.A.

63. Mazur, R.H.; B.W. Ellis;
P.S. Cammarata "A new Reagent for Detection of Peptides,
Nucleotides, and other N-H-containing
Compounds on Paperchromatogramms"
J.biol.Chemistry 237 (1962), 1619
64. Meister, A. "Biochemistry of the Aminoacids",
Academic Press 1957, 350
65. McGoodal, C.; C. Kirshner;
L. Rosen J.clin.Invest. 38 (1959), 707
66. McIsaac, W.M.; J.H. Page "The metabolism of Serotonin (5-Hydroxy-
tryptamine)"
J.biol.Chemistry 234 (1959), 858
67. McMillan, M. "Identification of Hydroxytyramine in a
chromaffine tumor" Lancet 1956/II, 284
68. Okubo, S. "Occurrence of N-Acetylhydroxytyramine
Glucoside in Drosophila melanogaster"
Med.J.Osaka University 9 (1958), 327
69. Palmieri, A.P.; D. Ikkos; R.Luft Acta endocr. (Kbh) 36 (1961), 549
70. Parham, W.J.; J.L. Anderson "The Protection of Hydroxyl Groups"
J.Am.Chem.Soc. 70 (1948), 4187
71. Partridge, S.M. "Application of the Paper Partition
Chromatogram to the Qualitative Analysis
of Reducing Sugars" Nature 158 (1946), 270
72. Partridge, S.M. "Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying
Reagent for Chromatography of Sugars"
Nature 164 (1949), 443
73. Paul, R. Bull. Soc. Chim.(5) 1 (1934), 973
74. Podloneky Virch. Arch. 306 (1940)
75. Possompès, B. "Recherches Experimentales sur le
determinisme de la Metamorphose de
Calliphora erythrocephala Meig"
Arch.de Zool.Exp.et Gén. 89 (1953), 204
76. Richards, A.G. "The integument of arthropods"
Minneapolis 1951
77. Rydon; Smith "A new method for the Detection of
Peptides and similar Compounds on Paper
Chromatogramms" Nature 169 (1952), 922

78. Sack, H.; Joh.F. Koll "Ungewöhnliche Beobachtungen beim Phäochromocytom"
Dtsch.med.Wschr. 84 (1959), 733
79. Sack, H.; Joh.F. Koll "Die Klinik des Phäochromocytoms"
Ergeb.ninn.Med.Kinderheilk.
Neue Folge Bd. 19 (1963), 289
80. Schayer, R.W.; S.A. Karjala "Ring-N-Methylation - a mayor route of histamine metabolism"
J.biol.Chemistry 221 (1956), 307
81. Schlossberger, I. "Über den Tyrosin-Stoffwechsel bei der Wildform und einer Albinomutanten von Schistocerca gregaria Forskal"
Dissert. München 1961
82. Schümann, H.J. "Die biochemische Diagnose des Phäochromocytoms"
Dtsch.med.Wschr. 86 (1961), 2016
83. Sekeris, C.E. "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten XII: Reinigung, Eigenschaften und Substratspezifität der Dopa-Decarboxylase"
Z.physiol.Chemie 332 (1963), 70
84. Sekeris, C.E. "Zur vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels" Dissert. München 1962
85. Sekeris, C.E. "Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels der Fliegen durch Ecdyson"
Tagung d.Ges.f.physiol.Chemie,Wien, Sept. 1962
86. Sekeris, C.E.; P. Karlson "Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VII: Der katabolische Abbau des Tyrosins und die Biogenese der Sklerotisierungssubstanz N-Acetyl-dopamin"
Biochim.biophysica Acta 62 (1962), 103 unveröffentlicht
87. Sekeris, C.E.; P. Karlson "Manometric Carbon Determination"
J.Biol.Chemistry 136 (1940), 509
88. Slyke, D.D.van; J. Folch Biochim.biophysica Acta 60 (1962), 420
89. Smith, A.A.; S.B. Wortis "Formation and Metabolism of N-acetylnormetanephine in the rat"

90. Spackman, D.H.; W.H. Stein;
St. Moore "Automatic Recording Apparatus for Use
in the Chromatography of Amino Acids"
Analytical Chem. 30 (1958), 1190
91. Stadtman, E.R.; H.A. Barker "Fatty Acid Synthesis by Enzyme Pre-
parations of Clostridium Kluveri"
J.biol.Chemistry 180 (1949), 1085
92. Stahl, E. "Dünnschicht-Chromatographie I"
Pharmazie 11 (1956), 633
"Dünnschicht-Chromatographie II"
Chemikerzeitung 82 (1958), 323
93. Sturm, jr. A. "Erhöhtes Vorkommen, Bedeutung und Be-
stimmung der Vanillinsäure im Harn beim
Phäochromoblastom"
Dtsch.med.Wschr. 88 (1963), 1000
94. Tabor, H.; A.H. Mehler;
E.R. Stadtman "The enzymatic acetylation of Amines"
J.biol.Chemistry 204 (1953), 127
95. Tabor, H.; E. Mosettig "Isolation of Acetylhistamine from urine
following oral Administration of Histamine"
J.biol.Chemistry 180 (1949), 703
96. Urbach, K.F. "Nature and Probable Origin of Conjugated
Histamine after Ingestion"
Proc.Soc.Expt.Biol. (N.Y.) 70 (1949), 146
97. Walton, J.N. "Phaeochromocytoma of the Adrenal"
Lancet 1950/I, 438
98. Weissbach, H.; B.G. Redfield;
J. Axelrod "The enzymic acetylation of serotonin
and other naturally occurring amines"
Biochim.biophysica Acta 54 (1961), 190
in HEILMEYER's Lehrbuch der inneren
Medizin, Springer Heidelberg 1961
99. Weissbecker, L. "Die phäochromen Granula des Nebennieren-
marks im elektronenmikroskopischen Bild"
8. Symp. dt.Ges.Endokrin. 1962
100. Wetzstein, R. "Detoxication Mechanism" London 1959
101. Williams, R.T.

102. Zeller, E.A.; J. Barsky; J.R.Fouts; "Influence of Isonicotinic Acid
W.F.Kirchheimer; L.S. van Orden Hydrazide (INH) and 1-Isonicotinyl-
2-isopropyl Hydrazide (IIH) on Bacterial
and Mammalian Enzymes "
Experientia 8 (1952), 349
103. Kongreßbericht in den Annals of the N.Y. Ac. Sci. Vol 80 (1959), 551
"Amine oxidase Inhibitors "

Lebenslauf

Am 10. November 1940 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Albert Herrlich und seiner Frau Helma, geb. Sämmer in München geboren. Ich bin katholischen Bekenntnisses.

Nach drei Jahren an der Volksschule, Südliche Auf-fahrtsallee, besuchte ich die ersten beiden Klassen des Privatgymnasiums Adam in München und trat dann in die 3. Klasse des staatlichen Wittelsbacher Gymnasiums am Marsplatz über. An dieser Schule bestand ich im Juli 1958 die Reifeprüfung des humanistischen Zweigs.

Im Wintersemester 1958/59 immatrikulierte ich mich in der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Abgesehen von einem Kranken-pflege-Praktikum und einem Sprachkursus in England studierte ich immer in München. Hier bestand ich im Wintersemester 1960/61 das Physikum und famulierte am Pathologischen Institut und an der I. Medizinischen Universitätsklinik. Vom 1. Februar 1962 bis 30. April 1963 arbeitete ich als Doktorand am Physiologisch-chemischen Institut im Labor von Professor Karlson.

